

no 100

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis REVOL

Pharmacien

Chef de travaux pratiques à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES GLANDES
SURRENALES DE QUELQUES MAMMIFÈRES. ÉTUDE
COMPARÉE DES ZONES CORTICALE ET MÉDULLAIRE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 20 Février 1931 devant la Commission d'examen

MM. CARDOT, *président.*

BEAUVÉRIE

FROMAGEOT

LEULIER

} *examinateurs.*

BOURG

IMPRIMERIE VICTOR BERTHOD

1931

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis REVOL

Pharmacien

Chef de travaux pratiques à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES GLANDES
SURRENALES DE QUELQUES MAMMIFÈRES. ÉTUDE
COMPARÉE DES ZONES CORTICALE ET MÉDULLAIRE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 20 Février 1931 devant la Commission d'examen

MM. CARDOT, *président*.

BEAUVÉRIE	} <i>examineurs.</i>
FROMAGEOT	
LEULIER	

BOURG

IMPRIMERIE VICTOR BERTHOD

—
1931

UNIVERSITÉ DE LYON — FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen :

M. GRIGNARD, O. *,  I,  P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.

Assesseur :

M. VANEY, *,  I, .

Professeurs honoraires :

MM. VESSIOT, O. *,  I;
GERARD, O. *,  I,  C;
RIGOLLOT, *,  I;
OFFRET, *,  I, 
COUTURIER, *,  I, 
KOEHLER, O. *,  I, .

Professeurs titulaires :

MM. GRIGNARD, O. *,  I,  P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.
DULAC, *,  I, Calcul différentiel et intégral.
MASCART, *,  I,  Astronomie physique.
SIRE,  I,  Mécanique rationnelle et appliquée.
MEUNIER, *,  I, Chimie industrielle.
BEAUVIERIE, *,  I,  Botanique.
THOVERT, *,  I,  Physique.
CARDOT,  Physiologie générale et comparée.
VANEY, *,  I,  Zoologie.
LONGCHAMBON, *,  Minéralogie théorique et appliquée.
LOCQUIN, *,  I, Chimie générale.
ROMAN,  Géologie.
DEJARDIN,  Physique.

Professeurs titulaires (sans chaire) :

MM. DOUIN,  Botanique.
LEMARCHANDS,  I, Chimie industrielle.
EYRAUD,  Mathématiques.

Maîtres de Conférences et Chargés de Cours complémentaires :

MM. SOLLAUD,  I, Zoologie.
AUMERAS, Chimie physique.
FROMAGEOT, Chimie biologique.
BONNET,  I, Zoologie appliquée et Zootechnie.
MAYET, *,  I, Anthropologie.
PELOSSE,  I, Sériciculture.
DONCIEUX,  I, P. C. N., supérieur.
SEYEWETZ, *,  I, Matières colorantes artificielles.
M^{lle} BACHRACH,  Physiologie.
DARESTE de la CHAVANNE,  I, Géologie.
DUFAY, Astrophysique.
VIRET, Etude des roches.

Secrétaire :

M^{me} NÉTIEN, .



Contribution à l'étude biochimique des glandes surrénales de quelques Mammifères

Étude comparée des zones corticale et médullaire

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE PHARMACIE ET PHARMACOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE MAÎTRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LEULIER

Professeur de Pharmacie et de Pharmacologie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Chevalier de la Légion d'Honneur.

INTRODUCTION

L'étude des surrénales humaines ou animales a fait le sujet d'innombrables publications d'ordre anatomique, histologique, physiologique, biochimique et chimique et il serait, sinon impossible, du moins très difficile et, en fin de compte décevant, d'en vouloir dresser un inventaire complet. Aussi tel n'est pas le but que nous poursuivons dans ces pages préliminaires. Cependant comme il importe de préciser l'origine et le pourquoi de ce travail, il nous semble nécessaire de schématiser à l'extrême les théories admises de façon universelle ou par une majorité de chercheurs.

Formées de deux parties d'origine, de structure, et de rôles différents, les glandes surrénales des Mammifères comprennent en gros une zone corticale et une zone médullaire.

La première s'est révélée aux histologistes comme particulièrement riche en lipides et les études des chimistes, portant presque toujours sur la glande totale, ont confirmé cette notion de richesse exceptionnelle qui se traduit parfois et entre autres choses par des pourcentages impressionnants de cholestérol. Aussi, pour les uns, la cortico-surrénale est-elle cholestérogène (CHAUFFARD et son école) alors que pour d'autres elle est simplement cholestéropexique

(ASCHOFF et ses élèves). En dehors de cette intervention dans le métabolisme des lipides, la cortico-surrénale offre des rapports avec la fonction génitale, neutralise différentes toxines et apparaît d'une nécessité impérieuse pour le maintien de la vie, mais ce sont là des rôles que nous signalons en passant, car ils sont tout à fait en dehors du cadre de nos recherches.

Quant à la zone médullaire qui possède des réactions de fixation et de coloration particulières, elle renferme une hormone cristallisée qui conditionne ses propriétés physiologiques les plus importantes. Quoiqu'il en soit de l'origine et du mode de formation de l'adrénaline, il est admis que la médullo-surrénale est une glande adrénalinogène. Le passage de l'adrénaline dans le sang, avec les conséquences physiologiques qui en découlent, semble établi par les expériences de TOURNADE dont les travaux ont emporté la conviction de la totalité des physiologistes. Ici encore, nous devons répéter que dans nos recherches, surtout d'ordre biochimique, nous ne ferons intervenir les données de la physiologie pure que dans la mesure où cela sera nécessaire pour l'interprétation et la discussion de nos résultats.

En somme, et en résumant au maximum, les capsules surrénales renferment deux glandes étroitement unies, mais dont les fonctions paraissent nettement différenciées. Il nous a donc semblé intéressant de rechercher si cette spécialisation physiologique entraînait des différences dans la composition chimique. Comme il n'apparaît pas que des recherches

systématiques aient été poursuivies dans ce sens, nous avons cherché à combler cette lacune et avons fait porter nos expériences sur les glandes des Mammifères qui sont communément et abondamment sacrifiés dans les abattoirs des grandes villes. La matière première ainsi recueillie, toujours très fraîche et provenant d'animaux sains, permet d'opérer sans crainte des phénomènes de cadavérisation ou autres, qui enlèvent tant de précision à l'étude des surrénales humaines.

D'après ce qui précède, on comprendra aisément que nos efforts aient d'abord porté sur la question de l'**adréalinogénèse**, et c'est pourquoi nous avons essayé, à l'aide de dosages chimiques, de préciser la répartition de l'adrénaline dans les deux zones. Avant d'adopter la technique que nous étudions plus loin, nous l'avons soumise à des expériences de contrôle et recherché les facteurs susceptibles d'influencer l'exactitude des résultats. Nous avons pu de la sorte reconnaître que la médullo-surrénale fraîche était très riche en principe actif alors que la corticale était extrêmement pauvre, à tel point qu'il était logique d'attribuer la présence d'adrénaline dans ce tissu à des erreurs de dissection.

D'autre part, et nous apportons de nombreuses preuves, il existe dans la zone médullaire une adrénaline masquée qui ne se décèle qu'après 24 heures de dessiccation dans le vide, alors qu'un semblable enrichissement ne peut se déceler dans les tissus de la cortico-surrénale.

Quant aux **lipides**, notre étude s'est poursuivie sur

un plan analogue à celui adopté pour les précédentes recherches. Mais, là nous avons envisagé diverses sortes de lipides, et plus particulièrement le cholestérol et ses éthers, comme aussi les phosphatides.

Voyons d'abord ce qui a trait aux premiers. La répartition du cholestérol peut s'étudier soit par des méthodes histophysiques ou histochimiques, soit par des méthodes chimiques. Dans le premier cas, elles restent qualitatives, dans le second elles sont quantitatives.

Lorsqu'on utilise les techniques histologiques, on décèle assez facilement au microscope polarisant des éthers cholestéroliques dans la zone corticale alors que la médullaire apparaît optiquement vide. Dans ce cas, le cholestérol libre reste rigoureusement invisible.

Si on essaie de compléter cette méthode physique par des méthodes dites de coloration on peut espérer déceler tout le cholestérol qu'il soit libre ou éthérifié, mais alors on aboutit à des résultats assez imprécis, car ou bien les réactions manquent de spécificité ou bien elles sont trop brutales.

C'est pourquoi nous avons eu recours à une réaction chimiquement spécifique et sans pouvoir destructeur vis-à-vis des tissus; il s'agit en l'espèce de la précipitation du cholestérol par la digitonine. Sans entrer dans des détails de technique qui seront précisés plus loin, nous avons constaté des phénomènes analogues à ceux donnés par l'observation directe. Nous avons vu que la zone corticale renfermait un

complexe biréfringent que diverses raisons permettent de considérer comme une combinaison de cholestérol et de digitonine, alors qu'il n'apparaît rien dans la zone médullaire. De ceci, il faut évidemment conclure que l'histo-chimie décèle du cholestérol dans une seule partie de la glande, ce qui est tout à fait conforme aux données acquises.

Qu'advient-il lorsque par des dosages colorimétriques ou pondéraux on cherche à se rendre compte de la répartition du cholestérol total, du cholestérol libre, et du cholestérol éthérifié. Ici les résultats deviennent tout à fait différents et l'on constate une distribution, sinon égale, du moins très voisine dans la plupart des cas, du cholestérol libre alors qu'un élément variable apparaît et c'est le cholestérol éthérifié.

Pour la détection et le dosage des lipides phosphorés dont la lécithine du jaune d'œuf est un des types les plus connus nous avons fait appel à des techniques purement chimiques. A l'aide de dosages de phosphore lipidique, nous avons vu que si la répartition des « lécithines » n'était pas égale dans les deux zones, il n'existait pas moins une quantité importante de phosphatides dans chacune d'elles.

Après ces recherches concernant les grandes fonctions des glandes surrénales, nous aurions voulu doser la plupart des éléments que l'on rencontre ordinairement dans les organes les plus divers des êtres vivants. Ces recherches nous auraient entraîné très loin, et c'est pourquoi nous avons limité nos

dosages à ceux de l'azote, du potassium, du soufre et du phosphore total.

Les dosages de l'azote, du potassium et du phosphore total n'appellent pas ici de commentaires particuliers tant au point de vue des techniques dosimétriques qu'au point de vue de leur répartition. Il n'en est pas de même du soufre. Depuis quelques années, une opinion se crée qui tend à attribuer aux surrenales un rôle thiopexique et une richesse particulière en glutathion. Sans avoir l'intention de doser spécialement ce complexe, nous avons étudié pour nous faire une opinion approchée, la répartition du soufre total, soufre organique et minéral. Nous n'avons obtenu des résultats satisfaisants qu'en ayant recours à la vieille méthode de LIEBIG.

Cet exposé sommaire rendra, nous l'espérons, compréhensible le plan adopté pour l'exposé de nos recherches, plan que nous développons ci-après :

PREMIÈRE PARTIE.

Dans cette partie **préliminaire**, nous rappelons très succinctement la constitution anatomique des glandes (Chapitre I). Puis, pour éviter les répétitions trop nombreuses, nous donnons un exposé des protocoles suivis et qui restent les mêmes au cours de tout le travail (Chapitre II).

DEUXIÈME PARTIE.

Avant d'étudier l'**adrénalinogénèse**, nous faisons un résumé de la plupart des recherches antérieures qui offrent le plus de rapport avec le but poursuivi par nous (Chapitre I). Nous procédons ensuite à un choix

parmi les méthodes chimiques de dosage et groupons en divers tableaux les résultats obtenus à l'aide d'une technique précisée, et en déduisons les principales conclusions (Chapitre II).

TROISIÈME PARTIE.

Comme pour l'adrénaline, nous avons d'abord étudié ce que l'on sait aujourd'hui des **lipides** surrénaux et comment on a pu, à partir du bloc hétérogène des « graisses », individualiser quelques éléments (Chapitre I). Nous avons ensuite effectué la détection histo-chimique du cholestérol libre dans la glande à l'aide de la méthode à la digitonine dont nous avons précisé le protocole (Chapitre II). Enfin, nous avons groupé, dans un dernier chapitre, les techniques que nous avons suivies pour les dosages du cholestérol et du phosphore lipidique, en même temps que les résultats et les commentaires qu'ils appellent (Chapitre III).

QUATRIÈME PARTIE.

Cette partie comprend l'exposé de nos recherches sur la distribution du **soufre**, de l'**azote** et du **potassium** dans la glande surrénale.

CINQUIÈME PARTIE.

On y trouvera groupés en une vue d'ensemble, les commentaires particuliers dont nous avons fait suivre chaque fois l'exposé de nos résultats partiels.

Cette vue d'ensemble précède immédiatement nos conclusions et nous a permis de rendre ces dernières aussi brèves que possible.

Avant de clore cette introduction il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous nos Maîtres qui, à divers titres, nous ont facilité notre tâche et permis de mener à bien ce travail.

Notre gratitude va d'abord à Monsieur le Professeur CARDOT qui a bien voulu accepter d'être le rapporteur de notre thèse. Nous l'en remercions très sincèrement.

Monsieur le Professeur BEAUVERIE, qui est aujourd'hui notre juge, nous a toujours accueilli avec la plus grande cordialité. Nous lui en sommes profondément reconnaissant.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Professeur FROMAGEOT qui a bien voulu accepter d'être notre juge.

Des liens trop intimes nous unissent à Monsieur le Professeur BRETIN pour qu'il nous soit permis de dire ici toute la reconnaissance filiale que nous lui avons vouée.

Monsieur le Professeur LEULIER nous a donné la trame de notre travail. Il en a dirigé l'exécution. Il a guidé pas à pas nos recherches. Aux heures grises où rien ne va, notre Maître sait trouver le mot d'encouragement. D'un résultat négatif, il saisit d'emblée une vue intéressante. Et cela avec cet enthousiasme, avec cette flamme qui vous transforment; une conversation de quelques minutes vous emplit d'optimisme : il semble que tous les obstacles se soient évanouis.

Nous ne pouvons dire dans ce cadre restreint tout ce que nous devons à notre Maître. Nous le remer-

cions sincèrement de tout ce qu'il nous a appris, de la discipline de travail qu'il nous a tracée, de la peine qu'il s'est donnée pour nous.

Mais plus encore, nous avons pu apprécier à côté de sa claire intelligence l'étendue de sa bonté et de l'affection qu'il nous porte. Nous le prions de croire à notre reconnaissance infinie et à notre respectueuse et entière affection.

Monsieur le Professeur MOREL ne nous a pas ménagé ses précieux conseils et ses encouragements; nous le prions d'accepter nos remerciements les plus sincères et les plus respectueux.

Monsieur le Professeur PAVIOT nous a toujours montré la plus grande bienveillance. Nous gardons de notre passage à son laboratoire de l'Hôtel-Dieu un souvenir ému. Monsieur le Professeur PAVIOT a bien voulu nous associer à ses travaux; qu'il soit assuré de notre respectueuse reconnaissance et de notre vive gratitude.

Monsieur le Professeur POLICARD nous a accueilli aimablement à l'Institut d'Histologie et a guidé nos recherches dans une partie de ce travail. Il nous a encouragé de ses conseils et a souvent fait preuve de la plus grande indulgence à notre égard. Nous l'en remercions bien sincèrement et le prions de croire à notre profonde gratitude.

C'est pour nous un devoir extrêmement agréable de dire notre reconnaissance particulière à deux de nos Maîtres qui nous ont en maintes circonstances témoigné leur sympathie.

Monsieur le Professeur Agrégé J. CHALIER nous a

dirigé vers le laboratoire et nous a bien souvent prouvé son amitié. Nous le prions de nous considérer parmi ses disciples comme un des plus fidèles.

Ce serait faire preuve d'ingratitude que de ne pas dire ici combien nous devons à Monsieur le Professeur Agrégé MANCEAU qui nous prodigua des encouragements précieux et nous rendit des services inestimables. Il fut à la fois pour nous un Maître et un Ami. Qu'il soit assuré de notre sincère reconnaissance et de notre respectueuse affection.

PREMIÈRE PARTIE

PRÉLIMINAIRES

CHAPITRE PREMIER

DUALITÉ MORPHOLOGIQUE DES ZONES SURRÉNALES

La plupart des travaux des chimistes sur la composition des capsules surrénales ont porté sur la glande entière comme s'il s'agissait d'un organe de composition homogène. La surrénale au contraire est formée de deux zones distinctes : à chacune de ces zones on a donné un nom qui rappelle sa situation dans la glande. La zone *corticale* enveloppe complètement la zone *médullaire*, mais l'une et l'autre gardent leur individualité.

A. Caractères embryologiques

Issues primitivement d'assises différentes, la corticale d'origine *mésodermique*, comme l'appareil génital, la médullaire d'origine *ectodermique*, comme le système sympathique, se retrouvent dans toute la série des Vertébrés avec des caractères différentiels bien définis.

Comme l'ontogénie, la phylogénie démontre que la surrénale des Mammifères est un organe double et résulte d'une association de deux tissus distincts.

Chez les Poissons, les deux substances sont indépendantes : le corps interrénal unique des Sélaciens (BALFOUR [32]) par son origine homologue du cortex, s'oppose aux corps suprarénaux, glandules situées en série double, accolées aux ganglions de la chaîne sympathique. Parfois ces glandules se rapprochent et s'accolent au corps interrénal (Cyclostomes). C'est le premier signe de cette juxtaposition que l'on retrouve chez les Batraciens; elle s'accentue chez les Vertébrés supérieurs. Une fine capsule conjonctive réunit chez les Reptiles les masses principales des deux substances qui se pénètrent chez les Oiseaux et reprennent chez les Mammifères leur individualité propre, mais alors, au lieu d'un simple accollement l'un des tissus englobe complètement l'autre.

Ainsi, chez les Mammifères seulement, les deux substances justifient leur appellation.

Le mode de formation si différent de chacune de ces zones permet de comprendre leurs relations parfois anormales, par exemple, l'existence d'amas corticaux dans la médullaire, et de cellules médullaires dans la corticale.

B. Caractères anatomiques

Le polymorphisme des capsules surrénales défie toute comparaison : il est impossible d'en schématiser, même d'une manière très approchée, la forme exacte. Elle varie non seulement d'espèce à espèce, affectant une apparence réniforme et globuleuse chez le mouton, arquée et cylindrique chez le porc, mais encore chez le même individu : ainsi, chez le porc,

la capsule droite, pyramidale, est toujours plus trapue que la capsule gauche qui est en croissant et généralement de forme plus allongée chez la plupart des animaux.

Naturellement, les dimensions, le poids et les caractères apparents varient, comme la forme de la glande, selon l'espèce, l'animal, la position. Le tableau suivant résume ces caractères et nous n'insistons que sur ceux qui distinguent les deux zones.

	Poids (en gr.)	Dimension moyenne (en cm.)	Rapport des poids corticale		
			médullaire	corticale	médull.
Mouton ...	1 à 2.85	2/1	4.5 1	rouge brique	rose violacé
Chèvre	1.07 à 2.50	2.5/1.5	4 1	bistre	café au lait
Bœuf	5.50 à 16	5/2.5	2* 1	rouge brun	gris rose
Veau	2.06 à 3.68	3.5/2	1 1	rouge	rose clair
Cheval	14 à 30	10/4		brun	gris clair
Porc	1.50 à 3.50	4.5/1.5		rouge brun	gris rose nacré
Cobaye ...	0.13 à 0.25		8.5** 1	jaune sale	gris

*Caractères apparents de quelques glandes surrénales
étudiées dans ce travail.*

En effet, une simple coupe macroscopique révèle la formation hétérogène des deux parties; la périphérie est occupée par une zone plus ou moins large

* d'après TOUJAN [134].

** d'après PETTIT [13].

selon l'âge et l'espèce de l'animal, généralement brune, en tous cas plus foncée que le reste de la glande. Cette zone corticale est emprisonnée dans une gaine conjonctive, hérissée de saillies et creusées de sillons qui s'enfoncent dans l'intérieur de la glande et dans lesquels pénètrent avec les vaisseaux et les nerfs, des filaments conjonctifs issus de la gaine d'enveloppe.

La zone médullaire de teinte plus claire, et comme brillante chez certains animaux (porc), borde la grosse veine médiane à orifice parfois béant.

Entre les deux zones, on voit une assise moyenne qui simule un liseré brun-verdâtre chez le cobaye, noir chez l'homme, blanchâtre chez le mouton, et dont la fonte par autolyse et putréfaction est à l'origine de la dénomination « capsule ».

C. Caractères histologiques

C'est particulièrement au point de vue histologique que les deux zones accusent une individualité différente à tel point qu'on ne les étudie jamais ensemble. Les histologistes admettent en effet l'existence dans la capsule surrénale des Mammifères *d'une glande cortico-surrénale et d'une glande médullo-surrénale* juxtaposées il est vrai, mais de nature essentiellement différente.

1) LA GLANDE CORTICO-SURRÉNALE, enveloppée d'une capsule fibreuse mince, est constituée par le groupement en cordons de cellules sécrétrices.

La cellule corticale est individualisée, mais, selon

sa localisation, elle diffère et chacune de ses formes répond, d'après les données actuelles, à une étape différente de son évolution. On a l'habitude, depuis ARNOLD, de diviser la glande corticale d'après la disposition des cordons, en trois zones, qui se succèdent par transition ménagée.

a) La *glomérulée* est la partie la plus externe. Les cellules y sont petites, faciles à colorer, et les cordons incurvés sur eux-mêmes ressemblent à des glomérules de glandes sudoripares. D'ailleurs leur disposition varie avec les espèces : ainsi, chez le cheval, RENAULT [16] les a décrit en arcs de demi-cercles (zone des arcs), tandis que chez d'autres espèces, la région est indifférenciée (homme). Ces dispositions sont si caractéristiques qu'un simple examen de cette couche permet à un œil exercé de distinguer l'espèce animale à laquelle appartient l'organe.

b) La *fasciculée* est au contraire toujours bien différenciée; les cordons qui sont parallèles entre eux lui donnent une structure radiée; comme chaque cordon est formé d'un assez grand nombre de cellules, volumineuses, cette zone occupe un large espace dans la glande cortico-surrénale.

GUIEYSSE [8] divise la fasciculée du cobaye en deux parties : la plus externe est formée de cellules d'apparence spongieuse (spongiocytes), énormes, à gros noyau et à protoplasma ressemblant à une « mousse très légère », « à du blanc d'œuf très battu », d'où le nom de « spongiosa » sous lequel on désigne cette région si marquée chez le cobaye et moins bien délimitée chez d'autres animaux. La partie interne de

la fasciculée, formée de cellules en travées fait une transition avec la réticulée.

c) La *réticulée* est la région la plus interne de la corticale. Les cellules y sont réparties en réseau autour d'énormes capillaires sanguins. C'est une zone extrêmement vaste, riche en pigments et dont les assises de cellules les plus proches de la médullaire s'autolysent avec grande facilité.

On admet que la cellule corticale, partout la même, et qui descend au cours de son évolution vers la réticulée, est essentiellement un élément à *lipides*, notamment dans sa forme adulte où elle apparaît bourrée de vacuoles lipidiques (spongiocytes).

2) La GLANDE MÉDULLO-SURRÉNALE est également constituée par des cellules spécialisées très particulières et qui sont caractérisées à la fois par leurs réactions histo-chimiques (réaction chromaffine : granulations colorées en ocre par les sels de chrome) et leurs réactions physiologiques (sécrétion d'*adrénaline*).

Les cellules chromaffines sont groupées en cordons orientés autour de sinusoides sanguins; elles constituent le tissu médullaire également caractérisé par la présence de nombreuses cellules sympathiques, de même origine et de même rôle que les cellules chromaffines. Cette association, qu'on rencontre ailleurs, de cellules sécrétant l'adrénaline et de cellules nerveuses sympathiques, fait donner à ce tissu, le nom de tissu para-sympathique ou para-ganglionnaire.

Toutes les cellules ne paraissent pas également riches en ces granulations chromaffines, qu'on iden-

tifie à l'adrénaline existant sous un état indéfini. C'est dans la région centrale de la médullaire qu'elles sont les plus abondantes.

La médullaire est riche en fibres élastiques qui doivent favoriser l'évacuation du sang veineux hors des tissus de l'organe. La recherche de ces fibres élastiques par l'analyse chromatique permet à la fois de situer de façon indéniable la limite de séparation des deux zones, et de découvrir des amas de cellules médullaires, fréquemment égarés dans la corticale.

Enfin, partout existe une énorme vascularisation; les capillaires sont de larges sinusoides remplis de sang veineux qui se réunissent en troncs, origines de la grosse veine centrale.

Tous ces faits d'ordre divers, *embryologique, anatomique, histologique*, s'accordent pour démontrer l'existence d'un « *appareil surrénal* » (DA COSTA [3]). Il y a un système surrénal comme il y a un système hypophysaire, comme il y a un système thyroïdien.

Bien plus, chacune des zones possède, du moins d'après la grande majorité des chercheurs, une activité physiologique particulière : de sorte que la spécialisation anatomique et histologique semble entraîner une spécialisation physiologique. Mais tandis que pour certains la glande cortico-surrénale, et la glande médullo-surrénale constituent une association purement anatomique (SOULIÉ [18], SWALE VINCENT [283]), d'autres admettent une corrélation entre les activités physiologiques de ces deux glandes jux-

taposées ou intriquées (« symbiose de deux organes différents, d'origine différente, l'un lipogène, l'autre chromaffine », LAGUESSE [79]).

On comprend mal, dès lors, que les recherches chimiques sur les capsules surrénales aient généralement eu lieu sur la glande totale, sans souci aucun de l'individualité propre des tissus.

C'est pour essayer de combler cette lacune que nous avons effectué nos recherches purement chimiques, non plus sur l'organe tout entier mais séparément sur chacune des zones.

CHAPITRE II

OPÉRATIONS PRÉLIMINAIRES

Les opérations préliminaires qui sont sensiblement les mêmes pour chaque sorte de dosage que nous avons effectuée, comprennent essentiellement :

- Le prélèvement des glandes,
- Leur dissection,
- La prise d'essai.

Ces opérations ont pu généralement être accomplies en moins de deux heures (1). Elles étaient tout particulièrement accélérées, lorsqu'il s'agissait du dosage de l'adrénaline ou du phosphore des lipides.

A. Prélèvement

Nous avons nous-même recueilli les surrénales aux abattoirs de la Ville, nous avons pu nous renseigner approximativement sur l'âge des animaux et leur état sanitaire. En règle générale, nos expériences ont porté à la fois sur des animaux jeunes (agneau, veau), adultes (mouton, bœuf, porc), relativement vieux (chèvre, cheval (généralement châtré)). Tous ces ani-

(1) Grâce au concours des aides-chimistes du Laboratoire de l'hôpital Desgenettes et de notre camarade DENARD, que nous remercions très cordialement ici.

maux étaient *sains*, et c'est là un point à retenir. D'ailleurs, nous avons l'habitude de rejeter les glandes paraissant anormales (surrénales abcédées du mouton, surrénales hyperhémisées, etc...).

Le prélèvement était effectué dès que l'animal sacrifié était dépecé.

Ce prélèvement est d'ailleurs facile lorsqu'il s'agit de la glande gauche. Au contraire, celui de la glande droite, située souvent très en arrière et cachée par la masse du foie est plus délicat (veau). Aussi, comme la facilité de l'extraction conditionne la rapidité qui est elle-même un facteur important de réussite expérimentale, avons-nous quelquefois utilisé seulement la glande gauche pour le dosage de diverses substances, mais après avoir vérifié l'opinion classique de l'égale répartition de ces substances dans les deux glandes.

L'organe fut toujours manipulé avec le maximum de précautions, sans le serrer entre les doigts, sans l'entailler. Le mieux est de découper la glande avec le bloc grasseux qui la dissimule fréquemment (bœuf) et de ne l'extraire de ce bloc qu'à l'arrivée au laboratoire.

Les glandes étaient, pour le transport, déposées dans des béciers préalablement étiquetés, et plongeant dans l'eau glacée, si les dosages ultérieurs exigeaient cette précaution; ou dans des béciers laissés à température ordinaire, mais la glande se trouvait alors encore entourée de son enveloppe grasseuse.

Le transport au laboratoire avait lieu ensuite, et la

dissection commençait souvent *moins de 20 minutes après la mort de l'animal*.

B. Dissection

La préparation des lots pour les prises d'essais comporte deux phases :

1) *L'extraction* de la surrénale du bloc grasseux et le décollement des tractus qui entourent la membrane d'enveloppe.

2) Et, la glande une fois mise au net, *la séparation* de la médullaire et de la corticale.

La surface des surrénales est, selon l'espèce, nous l'avons vu, tantôt lisse et sans accidents, tantôt hérissée de saillies et creusée de sillons : cette seconde forme complique le travail de nettoyage.

Elle complique aussi la séparation des deux zones.

En effet, ces sillons, où pénètrent nerfs et vaisseaux, sont souvent poussés fort loin dans la profondeur de la glande, de sorte que la ligne de séparation des deux zones reflète l'aspect tourmenté de la surface. La séparation est alors particulièrement délicate.

~ Aussi avons-nous effectué cette dissection de façon différente selon qu'il s'agissait d'une capsule globuleuse, à surface lisse et unie, comme c'est le cas de la surrénale du mouton, de la chèvre, du veau, ou d'une capsule plus ou moins aplatie, à surface mamelonnée et accidentée (porc, bœuf).

La surrénale de mouton était tranchée en deux au rasoir dans le sens de la plus grande dimension, comme un haricot se partage naturellement en deux co-

tylédons. Ensuite, à l'aide de fins ciseaux, on entaillait dans chaque moitié la limite des deux zones, marquée par un liseré blanchâtre et passant un scalpel sous la médullaire, la dissection se poursuivait facile, par un véritable décollement de cette zone. Tout ceci était effectué avec minutie afin d'éviter toute pénétration du suc médullaire dans la corticale.

L'opération était autrement délicate lorsqu'il s'agissait de la surrénale de porc ou de bœuf. Chez celles-ci la corticale et la médullaire sont souvent plus ou moins intriquées. La médullaire est, d'autre part, minime. Aussi, chez le porc, dont la surrénale ressemble morphologiquement à la surrénale humaine, une coupe transversale montre un petit triangle gris rose de médullaire, entouré d'une corticale de volume énorme. Pour arriver à une séparation convenable, il faut couper la surrénale en tranches de 2 à 3 mm. et sur chaque tranche séparer aux ciseaux et au rasoir la médullaire mince de la corticale volumineuse.

Les surrénales de bœuf offrent une égale difficulté à la dissection.

Celles de cheval, plus aplaties que celles du bœuf, sont de dissection plus facile, car la médullaire se prête au décollement comme chez le mouton.

A mesure que la dissection se poursuivait, on réunissait les fragments en lots, évitant autant que possible la dessiccation. Sur ces lots on pratiquait la prise d'essai.

C. Prise d'essai

Selon les dosages, le poids des prises d'essai était différent et variait de moins de 0 gr. 50 (phosphore total) à plusieurs grammes (cholestérol et phosphore lipidique).

Aussi, selon la grosseur des surrénales, selon le but de l'expérience, la prise d'essai était-elle effectuée tantôt sur une seule glande, tantôt sur les deux glandes du même animal, tantôt sur un lot moyen. Généralement, on pratiquait les dosages en série (adrénaline, cholestérol) à la fois sur les surrénales d'un même individu, et sur un lot moyen. Ainsi chez le mouton, la chèvre, le veau, le porc, le lot « par animal » était formé de l'ensemble des deux surrénales, corticale et médullaire séparées, et le lot moyen groupait un nombre de surrénales, variable avec l'espèce, 20 à 30 de mouton, 15 de chèvre, 10 de veau ou de porc.

Chez les autres animaux, bœuf et cheval, une seule surrénale suffisait à effectuer plusieurs dosages et le lot moyen était formé de 5 à 10 glandes.

Toutes les fois que le lot de corticale et le lot de médullaire n'était pas entièrement utilisé dans la même prise d'essai, l'ensemble était préalablement rendu *aussi homogène que possible* avant d'effectuer cette prise d'essai. En effet, GARDNER ET FOX [6] disent combien il est insuffisant de partir d'un morceau d'organe : il vaut toujours mieux faire porter le dosage sur tout le tissu, ou tout au moins, avant la prise d'essai, il faut rendre le tissu aussi homo-

gène que possible et faire plusieurs dosages comparatifs sur le même lot. C'est ce que nous avons toujours fait.

La prise d'essai est déposée dans des récipients étiquetés et tarés, soit sur un verre de montre, soit dans le vase même où le dosage se poursuivra. La pesée est effectuée avec soin et le dosage est aussitôt mis en train.

Ainsi qu'il découle des opérations précédentes, tous nos dosages ont été effectués à partir de la **substance fraîche**, et tous nos résultats sont évalués en **grammes par kilog de substance fraîche**.

Aussi, dans le but d'établir ultérieurement une correspondance entre nos résultats et ceux des auteurs, qui sont souvent calculés à partir de l'organe entier et desséché, nous avons introduit ici un tableau de la teneur en eau des capsules surrénales étudiées, soit par rapport à la glande entière, soit en séparant corticale et médullaire.

	Glande entière	Corticale	Médullaire
Mouton	79.2	78.1	80
Chèvre	77.7	76.9	80.2
Bœuf	78.2	78	79
Veau	79.2	78	79.7
Cheval	75.6	75	78
Porc	75.5	75	79

Teneur en eau pour cent gr. de substance fraîche.

Il ressort de ce tableau que la teneur en eau est

bien voisine chez les divers animaux, et que la médullaire est un peu plus hydratée que la corticale, mais les différences sont très minimes. Au surplus, ces chiffres n'ont d'importance que pour le calcul des résultats rapportés à la substance sèche.

DEUXIÈME PARTIE

ADRÉNALINE ET SURRÉNALES

CHAPITRE PREMIER

ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION

L'adrénaline occupe une place éminente dans la physiologie de la surrénale. Pressentie d'abord par les physiologistes, puis découverte et isolée à l'état de pureté par les chimistes, l'adrénaline constitue le type des hormones strictement définies. C'est le premier principe des sécrétions dites internes qui ait été isolé à l'état cristallisé et pur, et cela explique, en partie, la place considérable que cette substance occupe dans la littérature scientifique.

A. AVANT LA DECOUVERTE ET L'ISOLEMENT DE L'ADRENALINE

La notion de sécrétion interne paraît déjà fort ancienne. BORDEU (d'après GLEY [68]) écrivait en 1775 : « chaque organe sert de foyer et de laboratoire à une humeur particulière qu'il envoie dans le sang ». HENLE (d'après LAGUESSE [79]) dès 1843 croyait que « dans les glandes vasculaires sanguines, le sang subit un changement, se dépouille de certaines substances qui subissent un mode quelconque d'élabora-

tion dans un parenchyme comme dans les glandes sécrétoires ». Mais ce n'étaient là que pures hypothèses, sans le moindre étai expérimental (GLEY [68]).

Les idées semblent seulement se préciser avec CHARLES ROBIN [122] en 1874, qui compare les glandes à sécrétion interne (celles que LAGUESSE [79] appellera plus tard les endocrines), au foie dont CLAUDE BERNARD avait récemment découvert la fonction glycogénique.

Cependant, on ne possédait que de rares données sur la surrénale, ADDISON [27] avait décrit en 1849 les symptômes de la maladie bronzée qui porte son nom et l'avait attribuée à une dégénérescence des capsules surrénales. L'année suivante VULPIAN [143] montrait qu'une coupe de surrénale se colore en gris vert par le perchlorure de fer et que la goutte de liquide sanguinolent qui s'écoule par pression légère de l'orifice veineux de la glande présente la même réaction. Cette découverte est bientôt confirmée par VIRCHOW [142] en 1857 et par tous les auteurs. HENLE [74] avait montré, dès 1843 que les sels de chrome coloraient les coupes de surrénales en brun. La réaction chromaffine de HENLE, localisée dans la partie centrale de la glande, est l'équivalent de la réaction chromophile de STILLING [128] (1890), et de la réaction plœochrome de POLL (d'après TOURNADE [19]).

Le mémoire d'ADDISON [27] donne à la question des surrénales un relief nouveau. La recherche histologique s'améliore, aidée par quelques réactions chimiques grossières, utiles cependant. La théorie des humeurs de CLAUDE BERNARD s'affirme, et

BROWN-SÉQUARD [44] entreprend l'expérimentation physiologique.

Par l'ablation des capsules surrénales, il démontre que ces glandes sont nécessaires à la vie, mais ses travaux soulèvent de vives critiques. Tandis que certains physiologistes croient que la mort de l'animal en expérience résulte de la gravité de l'opération et non de la soustraction d'un organe indispensable, d'autres découvrent que des animaux résistent à l'ablation des deux capsules. Il a fallu les expériences d'ABELOUS et LANGLOIS (1891-1897) pour confirmer définitivement les résultats de BROWN-SÉQUARD. La surrénale apparaît indispensable, et la mise en évidence de capsules accessoires, organes vicariants des capsules surrénales, explique également les cas de survie.

La méthode d'ablation des surrénales permet aux physiologistes d'étudier, non seulement le rôle de ces glandes, mais encore le rôle propre des deux parties de la glande.

Un second procédé de travail, conduisant à peu près aux mêmes buts est celui des *extraits d'organes*. En 1894, G. OLIVER et E. S. SCHAFER [112] découvrent l'action des extraits surrénaux sur la pression artérielle et sur le cœur. « Pour la première fois, un extrait d'organe apparaissait comme doué d'une activité physiologique spécifique, déterminant, à l'instar d'une action nerveuse, un fonctionnement : il contenait donc une substance possédant cette propriété » (E. GLEY [66]).

A la suite d'OLIVER et SCHAFER les recherches se

multiplient et la méthode des extraits d'organes se montre d'une grande fécondité. SZYMONOWICZ (1895 [131]) montre que l'abaissement de pression dû à l'extirpation des deux surrénales peut être enrayé, du moins temporairement, par une injection d'extrait surrénal. CYBULSKI [54*] la même année et LANGLOIS [82] en 1897 annoncent que le sang veineux surrénal, comme l'extrait surrénal, est doué de propriétés hypertensives.

Rapprochés de la réaction de VULPIAN qu'on avait oubliée, cette découverte établit de manière indiscutable la réalité d'une sécrétion interne, au moins pour la partie médullaire.

MOORE [95*] du Laboratoire de E. S. SCHAFER signale le parallélisme entre l'activité physiologique des extraits et l'intensité de la réaction de VULPIAN : le chromogène semble identifié à la substance hypertensive, à l'isolement de laquelle tendent alors les efforts des chimistes. L'adrénaline est bientôt découverte : c'est le premier principe actif d'une sécrétion interne qui ait été identifié sans conteste; mais ceci n'implique pas que l'adrénaline représente à elle seule toute l'activité physiologique des glandes surrénales.

B. L'ADRENALINE

I. Isolement -- Extraction

Il y avait longtemps que des tentatives étaient faites pour isoler le principe actif de la sécrétion interne.

Si GÜRBER (1897), ABEL et CRAWFORD (1897), ABEL (1898-1901), von FURTH (1898-1901) (d'après BARGER [33]) n'aboutirent pas au résultat espéré, ils ouvrirent du moins la voie où le japonais TAKAMINE [132] s'engagea avec succès. TAKAMINE découvrit l'adrénaline indépendamment, mais presque en même temps que l'américain ALDRICH [28] en 1901. Tous les deux obtinrent une poudre cristallisée dont ils précisèrent la composition $C^9 H^{13} O^3 N$. Bien que ce corps ait reçu plus de quarante dénominations différentes, on adopte généralement le nom adrénaline qui lui a été donné par TAKAMINE. Le terme épinéphrine (ABEL) que les anglais et les américains emploient volontiers prête à confusion avec un autre produit, plus ou moins impur et qui avait d'abord été isolé par ABEL. On rencontre encore fréquemment dans la littérature le terme suprarénine (von FURTH) et adrénine (seul terme utilisé dans *the Journal of Physiology*).

L'extraction de l'adrénaline a été effectuée par un grand nombre de procédés. Tous sont basés sur l'extraction par l'eau acidulée, la purification par l'alcool ou l'acétate neutre de plomb qui n'entraînent pas l'adrénaline, et sa précipitation des solutions aqueuses purifiées, par l'ammoniaque concentrée. Tous les procédés ont à compter avec la facile oxydation de ce corps. Aussi faut-il travailler dans une atmosphère d'hydrogène ou de gaz carbonique, ou dans un milieu réducteur.

TAKAMINE, ALDRICH (1901), ABEL (1903), BERTRAND (1904) et d'autres ont publié leurs techniques d'extraction. Celle de BERTRAND a permis à cet auteur,

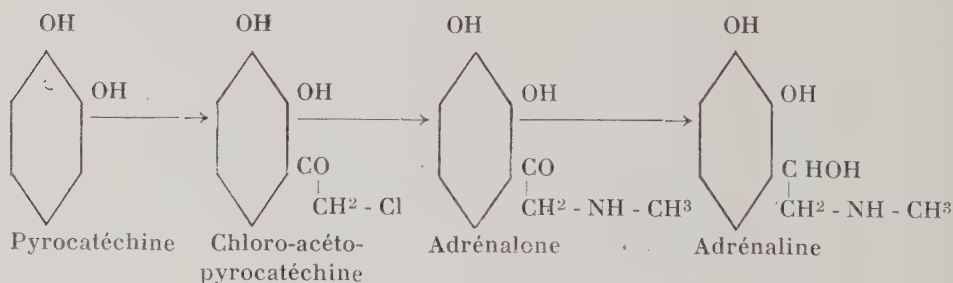
en partant de 118 kgs de glandes, provenant de 3900 chevaux, d'extraire 125 gr. d'adrénaline.

II. Constitution

L'adrénaline, une fois isolée à l'état pur, les chimistes se préoccupèrent de sa constitution. Les travaux d'ALDRICH, BERTRAND, ABDERHALDEN et BARGER, JOWETT, FRIEDMANN, FÜRTH, PAULY, STOLZ (cités d'après BARGER [33]) précisèrent la formule développée. L'adrénaline est particulièrement caractérisée par un noyau de benzène substitué par deux oxhydriles phénoliques, et par une chaîne latérale qui comprend un groupement méthylaminé et un groupement alcool-secondaire. Les propriétés chimiques de l'adrénaline sont entièrement sous la dépendance de cette constitution établie par la synthèse.

STOLZ, le premier réussit cette synthèse (1904).

En condensant la pyrocatechine avec le chlorure de chloro-acétyle, en présence d'un catalyseur, chlorure de zinc ou oxychlorure de phosphore, il obtint une chloro-acéto-pyrocatechine. Par action de la méthyl-amine, il se sépare, par condensation une méthyl-amino-acéto-pyrocatechine, l'adrénalone dont la réduction, d'ailleurs délicate, conduit à l'adrénaline racémique.



A côté de la méthode de STOLZ brevetée par MEISTER LUCIUS BRUNNING en 1904, beaucoup d'autres ont été proposées qui ne sont pas devenues industrielles.

En 1905, BARGER et JOWETT donnaient une synthèse à partir du pipéronal; mais il est difficile d'enlever le groupement CH_2 qui bloque les fonctions phénoliques, et d'après FOURNEAU [5], la méthode de STOLZ est encore actuellement la plus utilisée.

Quelle que soit la voie synthétique, l'adrénaline est obtenue racémique, tandis que le produit naturel est lévogyre. L'adrénaline naturelle serait au point de vue physiologique 10 à 15 fois plus active que la forme droite, et deux fois plus que la forme racémique (LAUNOY [83]). Aussi, FLACHER dès 1908, en partant de l'adrénaline racémique de synthèse entreprit-il de séparer les deux formes droite et gauche. Il y réussit en utilisant la différence de solubilité de leurs tartrates. Le tartrate droit d'adrénaline gauche cristallise le premier. La forme droite est à nouveau racémisée et dédoublée. On arrive ainsi à transformer enadrénaline gauche la presque totalité du produit de synthèse.

III. Propriétés physiques

L'adrénaline naturelle se présente sous forme d'une fine poudre blanche, cristallisée en masses sphériques ou en prismes visibles seulement au microscope. Elle est inodore et de saveur amère.

Sa température de fusion est différente suivant le procédé. Elle fond au bloc Maquenne à $+ 263^\circ$ et

par chauffage progressif à $+200$ à 212° . Elle fond d'autant plus bas qu'elle a été chauffée plus longtemps. Elle est peu soluble dans l'eau (quelques dix millièmes), elle se dissout davantage dans l'eau bouillante, et cristallise par refroidissement. Elle est très peu soluble dans l'alcool et les solvants organiques neutres en général.

L'adrénaline naturelle est lévogyre. La rotation spécifique prise sur une solution au 1/100 dans l'acide sulfurique déci-normal, à la température de $+20^{\circ}$, est égale à $-53^{\circ}3$ (BERTRAND).

IV. Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques de l'adrénaline peuvent toutes se rattacher à sa constitution. C'est un diphenol en ortho dérivé de la pyrocatechine, possédant dans une chaîne latérale une fonction alcool secondaire et une fonction aminée mono-substituée.

1) C'est à cette FONCTION AMINÉE que l'adrénaline doit son caractère basique. Cet « alcaloïde animal » se comporte comme une base, puisqu'elle donne avec les acides des sels qui cristallisent mal; mais c'est une base particulière, puisqu'elle ne précipite pas par les réactifs généraux des alcaloïdes et que d'autre part, à la faveur des fonctions phénoliques elle se dissout dans les alcalis caustiques. Comme la morphine, elle est précipitée par l'ammoniaque : c'est un des facteurs de son extraction. Elle se dissout très facilement dans les acides.

2) La présence d'un groupement ALCOOL-SECON-

DAIRE, dont la formation est le dernier stade et le plus délicat de sa synthèse, se vérifie par l'oxydation qui le transforme en cétone, l'adrénalone.

3) Les fonctions PHÉNOLS EN ORTHO de l'adrénaline lui communiquent de très importantes propriétés chimiques :

a. D'abord c'est un **réducteur** extrêmement puissant, et c'est à cette propriété qu'est dû le procédé de caractérisation histo-chimique de MULON [109] qui utilise les vapeurs d'acide osmique.

Elle réduit les sels d'argent et d'or (STOELTZNER [129]) et la liqueur de Fehling, caractères qui sont indiqués dans la Pharmacopée française.

C'est également l'existence des deux fonctions phénoliques en ortho qui l'ont fait prendre quelque temps pour la pyrocatéchine.

b. La contre partie de ces propriétés réductrices, c'est l'extraordinaire **oxydabilité** de l'adrénaline, et ses nombreuses conséquences.

Elle s'altère avec le temps, même dans le vide sec. A l'air, en particulier à l'air humide, elle prend très rapidement une teinte brune. Les solutions aqueuses deviennent roses en quelques jours. La conservation de ces solutions a fait l'objet d'un certain nombre de recherches. Le Codex français utilise un milieu acidifié et anti-oxydant, grâce au gaz sulfureux (RICHARD et MALMY [120]; BRETEAU [43] et DEBUCQUET [55] font dissoudre l'adrénaline dans l'eau bouillie et saturée à froid d'acide benzoïque. Ces formules donnent des solutions se conservant très bien, pourvu qu'elles soient tenues à l'abri de l'air et de la lumière.

c. C'est encore à la présence des deux fonctions phénol que sont dues la plupart des **réactions colorées** de l'adrénaline. Ces réactions sont extrêmement nombreuses et leur emploi, sujet à quelques causes d'erreur, rend cependant de grands services.

Principales réactions colorées de l'adrénaline.

Les réactions colorées dont il sera question dans ce travail trouvent seules place dans cette description.

C'est d'abord la réaction au perchlorure de fer due à VULPIAN qui l'avait signalée sur la surrenale et le sang veineux surrénal. Une trace d'adrénaline en solution neutre ou légèrement acide, donne avec une goutte d'une solution diluée de perchlorure de fer une coloration verte, qui vire au rouge par l'ébullition. En milieu alcalin, la coloration est pourpre, puis violette. Cette réaction a été utilisée en histochimie, réaction sidérraffine de CIACCIO, et dans le dosage chimique de l'adrénaline (BATTELLI [34]).

L'un des premiers procédés qu'aient employé les histologistes pour différencier le contenu des cellules médullaires repose sur l'emploi des sels de chrome (HENLE [74]). La réaction chromaffine a en histologie une réelle importance. La coloration ocre qu'elle présente caractérise un tissu, le tissu chromaffine (KOHN [77]).

C'est encore aux deux oxhydriles phénoliques de l'adrénaline qu'est due la réaction de FOLIN, CANNON et DENIS [62]. Le réactif phosphotungstique, utilisé aussi à la caractérisation et au dosage de l'acide

unique, est sensible à 1/3.000.000 pour l'adrénaline.

La réaction de MULON [109] à l'acide osmique est une succession de teintes, d'abord roses, puis noires; l'adrénaline est d'abord oxydée, puis l'acide osmique est réduit.

Toutes les autres réactions colorées classiques de l'adrénaline se terminent par une coloration rose due à l'oxydation de ce corps, qu'il s'agisse de l'oxydation directe par l'air, ou bien en présence de catalyseurs physiques (lumière), biochimiques (oxydases) ou chimiques.

Les solutions aqueuses d'adrénaline rosissent à l'air, et cette oxydation est favorisée par l'alcalinité du milieu. *Ainsi oxydée, l'adrénaline perd ses propriétés physiologiques* (BATTELLI [37]).

L'oxydation est accélérée par la catalyse lumineuse. Les rayons ultra-violets n'agissent que lentement en milieu acide, mais très rapidement en milieu alcalin (VACEK [136]); d'ailleurs, ce n'est pas, semble-t-il, une question de pH qui entre en jeu, mais plutôt une question de nature de l'acide (VACEK [137]).

Les oxydants activent également la réaction. GESSARD (1904) montrait déjà l'action de la tyrosinase. L'enzyme de la poche à encre des seiches (NEUBERG, 1908), la tyrosinase du *Russula delica* (ABDERHALDEN et GRUGGENHEIM, 1908) diminuent également la durée d'apparition de la teinte rose.

Ce sont surtout les oxydants chimiques qui ont été étudiés. Extrêmement nombreux sont ceux qui donnent des réactions pratiques. L'iode, l'acide iodique, le sublimé en présence d'un acide faible, les persul-

fates, les ferricyanures, les sels de manganèse, le nitrate d'argent en solution ammoniacale, oxydent tous l'adrénaline, et quelles que soient les modalités suivies, on aboutit toujours à une coloration rose. BORBERG (1912) croit qu'il s'agit du même composé d'oxydation. La coloration, suivant le cas, est plus ou moins stable et l'intensité est variable selon le réactif. Le plus sensible est le réactif au persulfate (PAN-CRAZIO-EWINS) qui atteint le 1/5.000.000. Mais cette réaction n'est pas toujours spécifique de l'adrénaline, certaines bases étant capables, comme elle, de s'oxyder en présence des mêmes réactifs (EWINS [58]).

Applications des réactions colorées de l'adrénaline à sa recherche qualitative et quantitative.

Quoique toutes ces réactions ne soient pas rigoureusement spécifiques, elles sont cependant largement mises à profit pour la recherche **qualitative** (1) et quantitative de l'adrénaline.

Pour l'appréciation **quantitative** de l'adrénaline deux moyens peuvent être envisagés suivant que l'on

(1) L'histo-chimie utilise un certain nombre de ces réactions pour mettre en évidence l'adrénaline. A côté des réactions chromaffine MULON [108] et sidéraffine CIACCIO [49], d'autres ont été signalées, qui sont fondées soit sur une modification de la réaction de HENLE (méthode de BAGINSKI au chromate d'argent [30]), soit sur la réduction de l'acide osmique. Les granulations que GRYNFELT [72] avait étudiées se colorent bien par la méthode de l'acide osmique en vapeur (MULON [109]) et celle-ci est devenue la méthode de CHEVREL (d'après PRENANT [118]) et de CROMER [53]. LAIGNEL-LAVASTINE [80] a basé son procédé sur la réduction du nitrate d'argent ammoniacal qui teint littéralement la médullaire en noir.

Mais cette technique, pas plus que les autres (en particulier celle qu'utilise la réaction chromaffine, VERNE [139]) ne peut, de toute évidence, être considérée comme susceptible de caractériser électivement l'adrénaline, le nitrate d'argent ammoniacal se réduisant le plus souvent sans cause apparente.

mettra en œuvre les réactions chimiques ou les actions physiologiques. Chacun d'eux offre des avantages et des difficultés variables.

La première méthode chimique quantitative date de 1902. C'est celle de BATTELLI [34] qui utilise la réaction de VULPIAN au perchlorure de fer, et apprécie la limite extrême de visibilité de la réaction. BATTELLI compare les résultats de sa méthode avec ceux que donne la méthode physiologique et trouve cette dernière moins avantageuse. Cependant, on peut reprocher à cette réaction colorimétrique d'être soumise à un certain nombre d'influences perturbatrices, telle que l'acidité (BOULUD et FAYOL [42]) et la concentration en FeCl^3 . D'autre part, il est difficile d'apprécier avec certitude la limite extrême de visibilité. Aussi, malgré les modifications apportées à la technique primitive et l'augmentation de sa sensibilité, soit par addition d'acide sulfanilique ou de sel de Seignette (von FÜRTH, 1901), elle paraît aujourd'hui complètement délaissée.

L'oxydation par l'iode déjà notée par VULPIAN [143] a donné lieu à un grand nombre de recherches. Les unes utilisent directement l'iode et font disparaître l'excès de réactif par l'éther (SCHUR) ou par l'hyposulfite (ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN [23]). D'autres emploient l'acide iodique (KRAUSS).

Un autre groupe de méthodes repose sur l'emploi du sublimé comme catalyseur d'oxydation (COMESATTI [51], 1909) en présence de sels d'acides faibles (EWINS, 1910). C'est cette réaction que BAILLY [31] a appliquée au dosage colorimétrique de l'adrénaline

pour lequel il a donné une technique généralement adoptée en France.

Enfin, la réaction à l'acide phosphotungstique de FOLIN, CANNON et DENIS [62] semble très appréciée en Amérique, à cause de sa sensibilité. Elle avait aussi l'avantage, au moment de sa parution où l'adrénaline était rare et coûteuse, de ne pas nécessiter une solution étalon d'adrénaline facile à remplacer par une solution d'acide urique.

Mais le réactif phosphotungstique est influencé par de multiples facteurs et sa sensibilité est trop grande. Les résultats qu'il donne sont fréquemment en contradiction avec ceux de la méthode physiologique si l'on en croit divers auteurs (SUGAWARA [130], MAIWEG [93], WATANABE et SUTO [144]).

V. Propriétés physiologiques

Etudier les propriétés physiologiques de l'adrénaline demanderait un vaste développement et TOURNADE [19] dans le t. IV du *traité de physiologie*, consacre plusieurs dizaines de pages à cette importante question. Aussi, notre intention est-elle de passer en revue les seules propriétés physiologiques essentielles, capables de se prêter avec plus ou moins de rigueur au dosage de l'adrénaline.

1. PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DE L'ADRÉNALINE, UTILISÉES AU DOSAGE.

a) La maladie qu'ADDISON [27] décrivit en 1855 offre entre autres symptômes une diminution de la

pression artérielle. Ce fait associé à la dégénérescence des capsules surrénales, autre caractère de la maladie, inspira sans doute les belles recherches d'OLIVER et SCHAFER [112]. Précédant de sept ans la découverte de l'adrénaline (1901), ces auteurs montraient dès 1894 l'effet hypertenseur des extraits surrénaux. CYBULSKI [54*] découvrait l'année suivante que le sang veineux surrénal présentait la même propriété. Ces faits démontrant que la surrénale était une glande à sécrétion interne, furent confirmés par de nombreux auteurs (SZYMONOWICZ, von FÜRTH, SW. VINCENT, LANGLOIS, etc.).

Extraits surrénaux et sang veineux surrénal doivent cette propriété à l'adrénaline, car lorsqu'on injecte quelques centièmes ou quelques dixièmes de mmgr. de cette substance dans les veines d'un animal quelconque, on constate, après un bref temps perdu, une élévation marquée de la pression artérielle précédée parfois d'une chute minime et fugace. La réaction du centre cardio-inhibiteur peut limiter l'élévation de la pression sanguine; aussi, après vagotomie bilatérale ou après atropinisation, l'hypertension atteint-elle son plus haut degré. C'est avec cette dernière modification que la réaction hypertensive est utilisée au dosage physiologique de l'adrénaline (*Pharmacopée américaine* [115]).

Les injections répétées n'engendrent ni accoutumance, ni effets cumulatifs, et, chaque fois, les mêmes réactions sont produites.

L'action est beaucoup moins marquée si l'introduction a eu lieu par voie sous-cutanée : la vaso-cons-

triction locale empêche l'absorption d'être rapide. Administrée par voie orale, l'action sur la pression artérielle est nulle.

b) L'adrénaline a une action directe sur le *cœur isolé* et entretenu par perfusion. Les battements sont plus forts et s'**accélèrent**. Le *cœur pris in situ* est au contraire **ralenti**, sauf si, par inhibition des vagues, on le soustrait à l'influence modératrice du bulbe.

c) Sur les artères, l'adrénaline et l'extrait surrénal produisent une **vaso-constriction** dont l'effet se démontre aisément : une muqueuse bien vascularisée et facile à observer comme la conjonctive pâlit par application de quelques gouttes d'une solution diluée d'adrénaline. La constriction est telle que l'on peut inciser sans saignement et que le pouvoir absorbant des surfaces traitées est annihilé.

De même le débit d'un organe perfusé est fortement réduit lorsqu'au liquide de perfusion on a ajouté de l'adrénaline (SALVIOLI, LÆVEN-TRENDELENBOURG).

En dehors de l'action sur le rythme respiratoire, sur les muscles striés, sur la nutrition et la thermogénèse qui ne présentent pas, pour la caractérisation et le dosage de l'adrénaline d'applications pratiques (1), nous retiendrons l'action de cette substance sur les muscles lisses.

Les muscles de l'appareil génital se contractent (lapin, chat) ou bien se relâchent (rat, cobaye) sous

(1) Cependant BLUM a donné une méthode de dosage reposant sur l'action hyperglycémiant, et par suite glycosurique, exercée chez les animaux par injection intra-veineuse d'adrénaline.

l'influence d'une injection intra-veineuse d'adrénaline.

Enfin, elle agit comme **mydriatique actif**, et cela à des doses infimes. Aussi, son action sur l'œil énucléé de grenouille (MELTZER) a-t-elle été souvent mise à profit pour la recherche et même le dosage de l'adrénaline dans les liquides organiques.

Les propriétés physiologiques de l'adrénaline sont influencées par un certain nombre de facteurs. En dehors du mode de pénétration (c'est par injection intra-veineuse que, en règle générale, les propriétés sont les plus marquées), en dehors de l'état du sujet et de l'influence d'agents chimiques de nature précise ou inconnue (1) introduits dans l'organisme en même temps que l'adrénaline, influences rapportées par TOURNADE [19], il est encore un facteur de grande importance : le sens de l'activité optique de l'adrénaline essayée. CUSHNY, d'après BARGER [33], (le chimiste même qui découvrit la différence d'activité physiologique des deux hyoscyamines énantiomorphes), montra que les actions physiologiques de la forme racémique et de la forme droite de l'adrénaline ne représentent respectivement que la moitié, et le 1/15 de celles que présente l'adrénaline naturelle lévogyre [54]. Aussi, la méthode physiologique de dosage est-elle intéressante à ce point de vue : elle permet dans un produit opothérapique ou dans une solution d'adrénaline, qui peuvent être

(1) Récemment BOIVIN [40] a montré le pouvoir inhibiteur de divers extraits d'organes sur l'action physiologique de l'adrénaline. Il semble, d'après cet auteur, que les extraits hydro-alcooliques de tous les organes soient capables d'atténuer la toxicité de l'adrénaline.

« renforcés » avec de l'adrénaline racémique, de distinguer entre ces formes, ce que les méthodes colorimétriques sont incapables de réaliser.

2. APPLICATION DE QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES AU DOSAGE DE L'ADRÉNALINE.

Les méthodes physiologiques présentent des techniques plus ou moins précises.

a) La méthode qui utilise l'**hypertension** produite par l'injection intraveineuse d'adrénaline (HOUGHTON, 1901) est pour ELLIOTT (1912) la meilleure. Elle possède d'après cet auteur « a mechanical accuracy ». Depuis 1916, c'est la méthode officielle de la *Pharmacopée des Etats-Unis* [115] où elle a été codifiée par CUSHNY. TIFFENEAU [133] a insisté en France sur l'importance de la méthode, et en a donné une technique précise.

Ce dosage consiste à faire l'étude comparée sur le même animal atropinisé, des variations de la pression artérielle, consécutives à l'injection intraveineuse, d'une part, de solution à titre connu d'une adrénaline type, et, d'autre part, de solutions obtenues avec les produits à doser.

Ces variations inscrites sur un cylindre enregistreur peuvent être comparées par simple superposition.

TIFFENEAU [133] attire l'attention sur l'intérêt de cette méthode indispensable à l'essai des adrénalines du commerce, de leurs solutions et des produits surrénaux. Elle aurait, au surplus, l'avantage d'être d'une exactitude satisfaisante (5 p. 100).

Malgré cela, elle n'est pas admise sans restrictions par tous les expérimentateurs. TOUJAN [134] et BATTELLI [34] la croyaient plus sensible que les réactions chimiques, mais inférieure à elles au point de vue de la précision. Plus près de nous, RICHAUD [121] critique sévèrement la méthode. « Les mêmes doses du même produit injectées au même animal, au cours d'une même expérience, ne donnent pas en général la même augmentation de pression ».

Les différences varient de l'égalité à 50 ou 60 p. 100 et RICHAUD sans rejeter le principe, demande qu'à cette méthode précieuse on donne une technique bien déterminée, et il ajoute, non sans ironie : « remarquons encore que la méthode permet au moins à un expérimentateur exercé de voir si le produit examiné est très actif ou à peu près inactif ». FABRE [60] enfin sans juger cette méthode avec autant de rigueur fait remarquer les causes d'erreurs possibles. « Les réponses de l'animal donnent des résultats remarquablement constants dans le cas d'essai des solutions d'adrénaline pure. Si parfois, lors de l'essai de préparations surrénales, on observe des divergences, celles-ci peuvent être expliquées par l'action de produits divers qui accompagnent le principe hypertenseur dans la glande ». Et cela paraît hors de conteste puisqu'on a pu isoler des substances hypotensives des capsules surrénales (ROGER [123]).

b) Une seconde méthode de dosage physiologique de l'adrénaline utilise la **vaso-constriction**. Elle consiste à mesurer le débit d'un organe perfusé de grenouille chez laquelle le système nerveux central a

été détruit. Le produit à doser est ajouté au liquide à injecter (LÆVEN-TRENDELENBOURG).

c) L'action de l'adrénaline sur les muscles est réalisée dans différentes techniques. La contraction de fragments d'artères de bœuf (MEYER, 1906), d'utérus isolé de lapin (FRAENKEL, 1906) est en effet provoquée par l'adrénaline, alors que cette même substance inhibe les contractions des anses intestinales de lapin (CANNON et DE LA PAZ, 1911) et de l'utérus non gravide de chat (DALE et LAIDLAW, 1912).

De ce dernier groupe de méthodes, basées sur la contraction musculaire, celles qui ont trait à l'action mydriatique de l'adrénaline ont pendant quelque temps joui d'une certaine faveur. La méthode à l'œil énucléé de grenouille, de MELTZER (1904) *sensible à 1/10.000.000* d'après EHLMANN (1905) et *seulement au 1/1.000.000* d'après BORBERG (1912) fut encore améliorée par SHULTZ (1909) au moyen du microscope.

Mais l'exactitude en est au moins, très approximative. Car, entre autres choses, il convient de souligner que la mydriase est un phénomène assez banal provoqué par nombre de produits organiques.

De toutes les méthodes physiologiques de dosage de l'adrénaline seules celles qui utilisent l'action sur le système circulatoire sont fréquemment employées. *La plus sûre est celle qui mesure l'augmentation de pression — la plus sensible, la méthode par perfusion.*

Beaucoup de méthodes de dosages de l'adrénaline qu'elles soient physiologiques ou chimiques, ont été critiquées. Les unes et les autres ont leurs avantages

et leurs difficultés. Il appartient au chercheur de choisir judicieusement d'après le sens des expériences poursuivies et aussi d'après la nature et le nombre des résultats nécessaires. Les méthodes physiologiques sont et restent seules capables de déterminer le sens d'une action pharmacodynamique, mais elles comportent trop d'inconnues pour égaler la rigueur d'un dosage chimique *vrai*.

C. L'ADRENALINE DANS LA CAPSULE SURRENALE

I. Localisation de l'adrénaline dans la surrénale des Mammifères

A la lumière des données apportées par les faits précédents nous allons voir les essais de localisation de l'adrénaline dans la surrénale et sa répartition selon les espèces animales.

1. TOUS LES AUTEURS S'ACCORDENT SUR LA PRÉSENCE D'ADRÉNALINE DANS LA MÉDULLAIRE.

VULPIAN [143] en 1856, avait déjà signalé que la coloration gris vert présentée par une coupe de surrénale traitée au perchlorure de fer, était limitée à la région centrale de la glande. Cette région *médullaire* est formée de cellules en cordons intriqués en réseau. Les intervalles libres sont occupés par de larges capillaires qui donnent à l'ensemble du tissu un aspect caverneux. Les cellules dont la forme

réelle est difficile à conserver en coupe, sont polyédriques. Elles contiennent en dehors de leur noyau arrondi, des mitochondries, quelques gouttes rares et inconstantes de lipides et surtout des granulations à réactions colorées plus ou moins spécifiques.

En effet, ces granulations se colorent en ocre-brun par les sels de chrome (nous avons vu que cette réaction sert à caractériser un tissu, le *tissu chromaffine* (KOHN [77]) ou *paraganglionnaire* (1) (DA COSTA [52])).

Quoiqu'il en soit, le perchlorure de fer teint la médullaire en gris-vert (VULPIAN [143], CIACCIO [49]) et l'acide osmique en rose, virant au noir (MULON [109]) : toutes ces colorations sont celles de l'adrénaline *in vitro*.

Pour CIACCIO [49], la réaction chromaffine et la réaction de VULPIAN ne sont pas équivalentes. L'une caractériserait une substance mère de l'adrénaline (grains chromaffines), l'autre l'adrénaline elle-même (grains sidéraphines).

Certaines cellules sont bourrées de granulations

(1) Ce n'est pas seulement dans les surrénales qu'on rencontre le tissu chromaffine. Certaines glandes, organes vicariants de la médullo-surrénale, certains organes (glande carotidienne de MULON, organe de ZUCKERKANDL) sont plus ou moins entièrement constitués par ce tissu (SW. VINCENT) [141]. L'adrénaline ne serait pas un produit de sécrétion propre de la médullo-surrénale, mais plus généralement du tissu para-ganglionnaire. L'agent toxique du venin de crapaud (NOVARO [110], H. JENSEN et K. CHEN [76]) est connu depuis ABEL et MACHT (étude sur la glande parotidienne du *Bufo Agua*, crapaud tropical, d'après BARGER [33]) : ce serait l'adrénaline. Or, le tissu de la glande venimeuse présente une réaction chromaffine intense.

Cependant, récemment, VERNE [139] par une étude systématique a montré que l'adrénaline n'était pas seule à donner la réaction chromaffine qui caractérise plus généralement les diphénols en ortho ou en para.

de ce genre, d'autres en contiennent peu ou pas: les auteurs par des théories diverses, expliquent leur transfert dans le sang.

2. L'EXISTENCE D'ADRÉNALINE CORTICALE EST DISCUTÉE.

La médullaire contient donc de l'adrénaline et tous les auteurs en conviennent. Mais il n'en est plus de même lorsqu'il s'agit de la zone corticale.

a. TOUJAN [131] a vu un petit nombre de grains chromaffines dans des points assez déterminés de la corticale. FUHRMANN [63] en rencontre dans la fasciculée et la réticulée.

Plus récemment CRAMER [53] en 1912 signale que lorsque la glande surrénale est en hyperactivité fonctionnelle, il apparaît dans les rangées de cellules corticales voisines de la médullaire, des granulations que l'acide osmique colore en noir et qui sont analogues aux granulations médullaires.

Cependant, nombre d'histologistes n'ont rencontré qu'accidentellement des granulations chromaffines dans la corticale, aussi MULON [109], LAIGNEI-LAVASTINE [80], CIACCIO [48] localisent-ils exclusivement la sécrétion adrénalinique dans la médullaire. CIACCIO [48] insiste sur la différence de structure de ces tissus, et d'autres auteurs (SOULIÉ [18]) sur leur origine différente. Depuis que BALFOUR a étudié dans une monographie remarquable [32] le développement des Sélaciens, un autre argument a été apporté à cette façon de voir. Chez les poissons, où les zones surrénales sont entièrement séparées, seules les glandes

correspondant soit par leur origine, soit par leurs caractères histologiques au tissu médullaire sont riches en éléments chromaffines (MULON [107]). Les corps suprarrénaux des Sélaciens, les « paired bodies », contiennent seuls de l'adrénaline (Sw. VINCENT [141]) tandis que les corps interrénaux, homologues de la corticale sont actuellement encore considérés comme lipidogènes. En confirmation de ce qui précède LUTZ et WYMAN [92] en 1927 n'ont pu mettre en évidence l'adrénaline dans les corps interrénaux de plusieurs espèces de raies.

b. Bien que les méthodes histologiques soient précieuses, aucune n'est entièrement spécifique : aussi pour départager ce qui revient à la corticale et à la médullaire a-t-on essayé la méthode physiologique. En injectant à un animal, convenablement préparé, des extraits de médullaire ou de corticale, il semblait possible d'obtenir des résultats plus probants. Malheureusement ces résultats ne sont guère concordants : ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN [24] notent une identité d'action des deux extraits. Tous les deux seraient hypertenseurs et l'extrait médullaire le serait plus que l'extrait cortical. « Mais cette différence n'est qu'apparente, elle est due à une différence de teneur des deux extraits en adrénaline ». SALVIOLI et PEZZOLINI [126] avaient déjà signalé un phénomène analogue. VASARHELYI [138] obtient avec l'extrait cortical une vaso-constriction dix à vingt fois plus intense que celle attribuable à l'adrénaline pré-

sente. M. FUJII [65] avec un extrait cortical sans adrénaline obtient de la vasodilatation (1).

Les résultats sont si discordants que les expériences physiologiques mériteraient d'être reprises en partant autant que possible d'une corticale exempte de médullaire, aussi est-il dès à présent intéressant de comparer l'action physiologique des corps inter-rénaux et des corps suprarénaux des Sélaciens : SW. VINCENT [141] a montré depuis longtemps que seuls les extraits des corps suprarénaux (qui sont parasympathiques) présentent une action hypertensive.

c. Les chimistes, qui se sont occupés en petit nombre de la question, signalent généralement l'existence de faibles quantités d'adrénaline dans la corticale. TOUJAN [134] avec la méthode à l'iode démontre que la cortico-surrénale de bœuf est relativement riche, surtout quelque temps après la mort (c'est d'ailleurs sur cette expérience qu'ABELOUS et son école appuient leur théorie de l'adrénalinogénèse de la corticale).

SUGAWARA [130] décèle et dose par la méthode de FOLIN de minimes quantités d'adrénaline dans la corticale de porc, bœuf, lapin, chien et chat. De même, WATANABE et SATO [144] trouvent avec le même réactif 1 p. 1000 d'adrénaline dans la corticale pure de lapin.

Mais ces dosages chimiques ont tous été effectués sur des corticales de pureté au moins relative. Il est

(1) De nombreux auteurs ont signalé la présence de choline libre dans la corticale (LOHMANN, d'après CIACCIO [168]). Cette seule présence de choline expliquerait l'action hypotensive et vasodilatatrice des extraits corticaux (VIALE [140]).

presque impossible de séparer de façon parfaite une corticale pure, soit chez les bovidés et le porc, soit chez les petits animaux. D'autres critiques plus graves ont été faites. Elles trouveront place plus loin.

Il en résulte donc que la question de la localisation de l'adrénaline dans la surrénale demeure en partie non résolue. Il semble bien qu'elle intéresse la médullaire seule. Mais la discordance des résultats laisse ouverte la question de l'adrénaline corticale.

II. Teneur en adrénaline des capsules surrénales des Mammifères

Plus étudiée et mieux connue est la notion de la quantité d'adrénaline dans les glandes surrénales.

1. LA TENEUR EN ADRÉNALINE DES SURRÉNALES PARAIT ÊTRE EXTRÊMEMENT VARIABLE

On a fixé habituellement (TOURNADE [19]) cette teneur à environ 1 pour 1000 de glande fraîche. BATTOLI [35] qui fut un des premiers à comparer les teneurs en adrénaline des surrénales de divers animaux trouvait des chiffres très variables d'animal à animal. Cependant, le rapport de la quantité absolue d'adrénaline des deux surrénales à un certain poids d'animal, le même pour tous les animaux, lui parut sensiblement constant.

FOLIN, CANNON et DENIS [62], à l'aide de leur méthode, ont trouvé les chiffres moyens suivants :

mouton	bœuf	veau
2 à 3	4	3.40
chat	lapin	chien
1.50	3.20	2.20

Ces chiffres, tous exprimés en gr. d'adrénaline par kilog. de glande fraîche, correspondent, d'après les auteurs, d'une manière parfaite avec ceux que donne le dosage physiologique.

Dans le même ordre d'idées, LEULIER et GOJON [85] ont utilisé la méthode de BAILLY et ont fait un grand nombre de dosages. Leurs chiffres sont moins élevés que ceux de FOLIN, CANNON et DENIS, comme il apparaît du tableau suivant qui les résume, et ne comporte que les moyennes et les chiffres extrêmes.

	Mo- yenne	Chiffres extrêmes		Mo- yenne	Chiffres extrêmes
Cobaye ...	0.15	0.10-0.22	Taureau ..	2.46	1.81-2.89
Chat	0.58	0.24-0.88	Vache	1.98	1.13-2.40
Chèvre ...	1.58	0.45-2.34	Bœuf	1.97	1.31-3.01
Mouton . .	1.02	0.73-1.76	Cheval	2.44	1.62-3.01
Porc	1.04	0.79-1.32	Chevreau .	1.44	0.79-2.07

La grande variabilité dans une même espèce, montre une fois de plus combien les chiffres moyens peuvent être fallacieux.

Dans les tableaux précédents il n'est pas question des surrénales humaines. Les chiffres, assez rares

d'ailleurs, que donnent les auteurs, sont entachés d'erreurs. Cela tient à la presque impossibilité que l'on a à se procurer des surrénales humaines prises *dès après la mort sur un individu normal*. Cependant d'après BATTELLI [36], LUCKSH [91], on admet qu'elles renferment environ le millième de leur poids d'adrénaline.

2. CAUSES DES VARIATIONS DE LA TENEUR DES SURRÉNALES EN ADRÉNALINE.

Les différences parfois considérables que les auteurs notent dans la teneur enadrénaline des surrénales d'une même espèce animale tiennent sans doute aux conditions de vie de l'individu et à son état physiologique ou pathologique, facteurs qui interviennent et modifient le contenu hormonal des surrénales.

Depuis le moment où l'adrénaline apparaît dans la glande (8^{me} jour chez l'embryon de poulet, MIZUHO OKUDA [111]) jusqu'à la mort de l'animal, ces diverses influences s'exercent librement dans des sens différents.

Il ne semble pas que l'âge intervienne beaucoup et cependant FENGER [61] note une diminution au cours de la croissance chez le bœuf et le porc. Ainsi chez le bœuf, il note :

	Fœtus de		Veau de 6/7	Bœuf
	3 mois	7/8 mois	semaines	
Poids d'une surrénale	0.3	0.9	2.2	12
Adrénaline % de pr. sec dégraissé ...	3.5	3.5	4	2.50

Par contre, SAITO [124] trouve la même teneur chez le fœtus de bœuf que chez l'animal adulte.

On a parlé de variations saisonnières de l'adrénaline; J. FUJII [64] croit devoir noter chez le lapin une diminution pendant l'été et une augmentation au printemps.

Comment se manifeste l'influence des facteurs *physiologiques* et *pathologiques*? Il y a longtemps que BATTELLI et BOATTA [38]) ont montré que le travail musculaire violent abaisse rapidement le taux d'adrénaline des surrénales, qui revient à la normale pendant le repos.

La frayeur (CANNON et DE LA PAZ [45]) provoque une décharge d'adrénaline, et diminue ainsi la teneur de la glande.

Les maladies longues (LOHÉAC [89]), les cachexies (BATTELLI [36]), les maladies infectieuses surtout (LUCKSH [91]) vident plus ou moins complètement la surrénale (SAJOUS [125]). C'est là une des raisons qui empêchent d'avoir une idée précise du taux normal d'adrénaline dans la surrénale humaine.

La question a été également étudiée dans les intoxications expérimentales. MANCEAU [94] et PITINI [116] ont montré l'influence de la narcose. HOUSSAY et MOLINELLI [75], MOURIQUAND, LEULIER et SÉDALLIAN [106] par des méthodes très différentes ont étudié l'action du choc anaphylactique. Beaucoup d'autres intoxications ont été réalisées par MOURIQUAND et LEULIER sur le cobaye dont les surrénales, grosses et faciles à prélever se prêtent particulièrement au dosage de l'adrénaline. Pour résumer leurs travaux à

ce sujet, on peut dire que tandis que la toxine tétanique [105] et l'avitaminose C [97] laissent invariable la teneur en adrénaline, au contraire la toxine botulique [106], l'inanition totale [102], et surtout la toxine diphtérique [104] l'abaissent considérablement.

L'importance et le nombre des facteurs modifiant le contenu adrénalinique de la surrenale permet d'expliquer à la fois les chiffres variables des auteurs, et les difficultés quasi insurmontables qu'ils ont rencontrées dans l'étude statique et dynamique de l'adrénaline.

III. Cycle de l'adrénaline surrenale

On a pu cependant, avec beaucoup d'efforts, établir un cycle de l'adrénaline. Nous nous en tiendrons surtout à la partie de ce cycle qui se passe dans la glande.

1. ORIGINE TOPOGRAPHIQUE ET CHIMIQUE DE L'ADRÉNALINE SURRÉNALE.

D'abord, avant le moment où l'adrénaline est décelable par ses réactifs dans la zone médullaire, dans quelles cellules, et à partir de quelles substances a-t-elle été élaborée ?

a. Origine topographique.

Le lieu de formation a été fort discuté : BATTELLI (d'après TOURNADE [19]) avait cru d'abord que les

surrénales étaient une sorte d'entrepôt où l'adrénaline formée dans d'autres tissus s'emmagasinait, mais cette opinion a été rapidement abandonnée par son auteur lui-même.

Il apparut bientôt que la surrénale élaborait elle-même l'adrénaline. ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN [25] les premiers semblent le démontrer. La surrénale isolée, pulpée, maintenue à 41° pendant 24 heures, en présence d'un antiseptique, contient plus d'adrénaline qu'au moment de la mort de l'animal. Les dosages ont été effectués par la méthode à l'iode [23].

Mais cette maturation, dans quelle région de la glande s'est-elle passée ? Alors qu'il semblerait logique d'attribuer à la médullaire seule ce rôle d'élaboration, quelques auteurs estiment que le tissu cortical intervient seul.

La base de cette théorie se trouve dans certains caractères physiologiques ou chimiques des extraits corticaux. Ces extraits se sont révélés hypertenseurs, nous l'avons vu, entre les mains de SALVIOLI et PEZZOLINI [126], d'ABELOUS et ses élèves [24], de JOSUÉ et BLOCH qui ont opéré avec des extraits d'adénomes [76*]). La chimie a apporté également un second groupe d'arguments. TOUJAN [134] renouvela sur la corticale de bœuf l'expérience conduite sur la glande entière : non seulement le cortex contient de l'adrénaline, mais c'est seulement dans cette zone que se passe un mûrissement. F. A. HARTMANN et W. E. HARTMANN [73] signalent plus récemment (1923) que la corticale d'une glande surrénale dont

la médullaire a été détruite donne encore la réaction colorée de l'adrénaline, par la méthode de FOLIN. ABELOUS et ARGAUD [20], en 1929, obtiennent un résultat semblable après que la moelle a subi une lyse microbienne.

Certains auteurs, et c'est le cas le plus fréquent, n'apportent pas de faits nouveaux et se contentent de discuter les expériences et d'émettre des hypothèses : c'est le cas de LÖWENTHAL [90] qui croit possible l'existence d'une pré-adrénaline corticale, qui devientadrénaline en passant dans la médullaire.

Cependant, ainsi que le pense TOURNADE [19], nombreuses sont les critiques qu'on peut adresser aux expériences qui sont le fondement de cette théorie. La divergence des résultats au sujet des propriétés physiologiques des extraits de corticale ne permet pas de conclure définitivement; les dosages chimiques précédents sont trop sujets à caution pour qu'on leur accorde une valeur quelconque. Enfin l'existence de glandules séparées chez le poisson et la présence d'adrénaline seulement dans les glandules correspondant par leurs caractères embryologiques et histologiques à la médullaire (1) est en contradiction formelle avec la théorie d'ABELOUS.

Cependant, malgré ces critiques et le peu d'intérêt qu'on attache généralement à l'adrénalinogénèse de la corticale, ABELOUS maintient son point de vue.

(1) LUTZ et WYMAN (1928) [92] font suivre l'exposé de leurs recherches sur la présence de l'adrénaline dans les corps inter-rénaux des Elasmobranches de la conclusion suivante : « The homology of this gland with the cortical tissue of the adrenal glands of the higher vertebrates adds to the conclusion that cortical tissue does not make adrenin ».

S'appuyant sur de nouvelles expériences, effectuées également sur des capsules de bœuf, mais en utilisant cette fois la méthode de BAILLY, ABELOUS et ARGAUD (1930) concluent « La formation de l'adrénaline, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, n'a pas lieu dans la médullaire, mais dans la corticale » [21].

b. Origine chimique.

Pas plus que sur le lieu de formation on n'est d'accord sur l'origine chimique de l'adrénaline. La connaissance de ce point d'un haut intérêt physiologique permettrait peut-être de dire s'il s'agit vraiment d'une hormone, ou d'un produit d'excrétion banal.

ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN [26] ont essayé d'enrichir une pulpe de surrénale en adrénaline, en l'additionnant d'acides aminés. Les mêmes auteurs prétendent avoir favorisé cet enrichissement en ajoutant à la pulpe surrénale des extraits d'organes divers (extrait de pancréas, etc.). Il s'agit là malheureusement d'expériences basées sur la méthode à l'iode et que BAYER [39] a vivement critiquées : la méthode à l'iode donnerait d'après BAYER des colorations roses avec divers acides aminés (alanine, phényl-alanine) lesquels se trouvent naturellement libérés par la fermentation.

D'ailleurs (d'après MAIWEG [93]) la méthode de FOLIN serait passible d'une cause d'erreurs analogue. Elle donnerait en effet *des chiffres trop élevés avec des solutions d'adrénaline partiellement décomposées*

dans lesquelles l'adrénaline est oxydée. Or, on sait que l'oxydation de l'adrénaline, loin d'augmenter son activité pharmacodynamique la réduit à zéro.

HALLE (d'après TOURNADE [19]) qui avait réalisé à partir d'acides aminés purs des expériences semblables à celles d'ABELOUS, obtenait lui aussi une augmentation de l'adrénaline appréciée par voie chimique; mais EWINS et LAIDLAW [59] utilisant la méthode physiologique n'ont pu trouver d'augmentation du pouvoir hypertenseur.

Beaucoup plus récemment ARNOLD et P. GLEY [29] étudiant les mêmes réactions concluent : « L'adrénaline ne paraît provenir dans les surrénales ni de la tyrosine, ni de la phényl-alanine, ni de la dioxyphényl-alanine, ni de la tyramine ».

2. ÉLABORATION DE L'ADRÉNALINE PAR LA SURRÉNALE.

Un autre fait semble acquis et positif, celui-ci : l'adrénaline se forme dans la surrénale, et on peut même, sinon caractériser sur place la substance qui la précède, du moins par des dosages bien conduits entrevoir cette sorte de libération de l'adrénaline, primitivement masquée à ses réactifs par suite de combinaison spéciale ou d'inachèvement de sa molécule.

Déjà en histologie CIACCIO [49] semble avoir vu quelque chose d'analogue. Les granulations chromaffines diffèrent, dit-il, des granulations sidéraffines. Les premières existent à la mort de l'animal, tandis que les secondes n'apparaissent que plus tard. Mais

ce n'est là qu'une simple indication, qui repose peut-être même sur une erreur d'interprétation.

Il appartenait aux chimistes d'éclairer la question. Entre les expériences d'ABELOUS et ses collaborateurs (1905) qui signalèrent les premiers un phénomène de mûrissement, et les travaux de MOURIQUAND et LEULIER (1926) rien n'a été fait. Il paraît y avoir eu une sorte de désintéressement de la question (LOHÉAC [89]).

Nous avons vu comment ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN faisaient mûrir la surrénale de bœuf : la pulpe surrénale placée à l'étuve à 41° dans l'eau physiologique en présence d'un antiseptique : le chlorétone, augmentait son adrénaline. MOURIQUAND et LEULIER [96] apportent une technique nouvelle : ils opèrent à froid, en utilisant simplement le vide sec et ils constatent un mûrissement généralement plus important que celui observé par ABELOUS. Le vide sec a cet avantage considérable sur la chaleur faible qu'il favorise la mise en liberté de l'adrénaline et évite en même temps toute cause d'altération. Il supprime du même coup la putréfaction, et l'oxydation, et ceci explique les chiffres plus élevés de MOURIQUAND et LEULIER [101]. MOURIQUAND, LEULIER et GONJON, multiplièrent les expériences sur la glande entière. Après un séjour de 24 heures dans le vide sec, les résultats que donne la méthode de BAILLY témoignent d'une augmentation de la richesse en adrénaline. Sans doute, trouvèrent-ils parfois des diminutions, mais elles furent toujours explicables par un retard à la mise en train ou par un vide imparfait,

c'est-à-dire somme toute, par une imperfection de la technique.

Nous avons groupé ci-dessous leurs résultats [86] : on pourra comparer les chiffres d'adrénaline à la mort de l'animal, et ceux que donnent la surrénale après un séjour dans le vide.

	Adrénaline par kilog de glande fraîche				
	A la mort de l'animal		Après séjour de 24 h. dans le vide sulfurique		
	Moyennes	Chiffres extrêmes	Moyennes	Chiffres extrêmes	Augmentation moyenne 0/00
Cobaye ..	0.15	0.10-0.22	0.24	0.15-0.31	0.09
Chat	0.58	0.24-0.88	0.90	0.30-1.87	0.32
Chevreau ..	1.44	0.79-2.07	1.59	1.18-2.09	0.15
Mouton ...	1.62	0.73-1.76	1.31	0.66-1.71	0.29
Porc	1.04	0.79-1.32	1.21	0.81-1.57	0.17
Taureau ..	2.46	1.81-2.89	2.78	1.95-3.75	0.32
Vache	1.98	1.13-2.40	2.33	1.76-3.75	0.35
Bœuf	1.97	1.31-3.01	2.50	1.81-3.07	0.53
Cheval ...	2.44	1.62-3.01	2.76	1.92-3.56	0.32

Cependant les résultats de MOURIQUAND et LEULIER ont été critiqués par MOLINELLI et MAZZOCCO [95] qui opposent les méthodes chimiques aux méthodes physiologiques. Or ces dernières ne décèlent jamais d'augmentation de la teneur en adrénaline (1).

MOURIQUAND et LEULIER [103] répondent en démontrant la spécificité de la méthode de BAILLY base de

(1) PAGET et LEBLOND [113*] viennent de démontrer par la *méthode physiologique*, la présence dans les capsules surrénales fraîches d'une adrénaline inactive qui ne se révèle qu'après dessiccation dans le vide sulfurique.

leur méthode de dosage, et critiquent la réaction physiologique « qui ne dose pas un élément chimique donné, mais apprécie un effet d'hypertension qui n'est qu'une somme algébrique d'éléments actifs soit dans le même sens, soit en sens inverse ».

D'ailleurs, les résultats de MOURIQUAND et LEULIER ont reçu confirmation.

Dans une note parue en 1918, le japonais KURIYAMA [78] expose des recherches sur l'influence de l'adrénaline sur le métabolisme des hydrates de carbone. Cet auteur est amené à doser l'adrénaline dès la mort de l'animal, et sur la même surrénale, après un ou deux jours de conservation à l'abri de l'air (acide pyrogallique) ou à l'air; l'auteur signale une diminution nette à l'air, et pas de diminution dans le milieu privé d'oxygène : or, si l'on regarde les chiffres de près, on constate un mûrissement.

Adrénaline par kilog de glande fraîche (lapin)				
A la mort de l'animal		1.64	1.39	1.66 1.01
après 24 ou 48 heures	à l'abri de l'air	1.81	1.44	1.68 1.76
	à l'air	0.43	0.53	0.99

LANGERON, PAGET et LOHÉAC [81] ont étudié le mûrissement et confirmé son existence. LOHÉAC donne dans sa thèse [89] une série de résultats intéressant la surrénale humaine.

A quoi répond cette constatation curieuse d'une adrénaline dissimulée à ses réactifs chimiques et que MOURIQUAND et LEULIER [96] ont appelée **adrénaline**

virtuelle ? Il semble que ces auteurs n'aient pas voulu émettre à son sujet la moindre hypothèse explicative. Le mot « virtuel » ne présage ni la dissimulation, ni la transformation.

Mais, il importe de ne pas confondre l'adrénaline virtuelle de MOURQUAND et LEULIER, avec l'adrénaline virtuelle d'ABELOUS et SOULA [22], adrénaline inactivée, qui serait d'après ces auteurs, la forme sous laquelle l'adrénaline disparaît dans le sang. Le terme qui a pour ABELOUS une valeur physiologique, veut dire que l'hormone n'a plus les propriétés physiologiques classiques, et désigne la fin du cycle visible de l'adrénaline. Pour MOURQUAND et LEULIER au contraire, l'adrénaline virtuelle précède l'ouverture de ce cycle et le terme n'a qu'une valeur biochimique — qui n'est pas encore décelable par ses réactifs chimiques.

3. DESTINÉE DE L'ADRÉNALINE.

a. Chez l'individu vivant.

Lorsque l'adrénaline a été élaborée dans la surrénale elle passe dans le sang veineux. Les cellules se vident peu à peu, et sans doute ne tardent pas à se recharger de granulations chromaffines. Comment ces granulations passent-elles dans le sang ? Les auteurs ne sont pas d'accord sur leur mode de passage. Certains croient qu'elles utilisent des solutions de continuité dans l'endothélium des capillaires (GOTTSCHAU, PFAUNDLER, CARLIER, MANASSE, (d'après TOUR-

NADE [19], d'autres qu'elles passent par simple exosmose (BONNAMOUR [41]).

Quoiqu'il en soit, l'adrénaline passe dans le sang : VULPIAN [143] l'avait déjà caractérisée en montrant que le sang veineux surrénal et le suc médullaire réagissent de la même façon vis-à-vis du perchlorure de fer. Plus tard, les histologistes décrivent les mêmes granulations dans le sang veineux, et MULON les identifie (1907). CYBULSKI [54*] avait déjà démontré que le sang veineux surrénal était hypertenseur; LANGLOIS [82] en confirmant cette découverte localisa le principe hypertenseur dans la partie liquide du sang.

L'étude des influences immédiates qui déterminent le passage de l'adrénaline dans le sang, et sa destinée dans l'organisme a donné lieu à de nombreux travaux dont l'exposé ne trouve pas place ici. La notion d'adrénalémie physiologique semble définitivement établie par les expériences de TOURNADE et CHABROL [135], elle est même admise par GLEY [63] qui l'avait niée jusqu'alors (GLEY et QUINQUAUD [69]). Mais à nouveau les opinions sont contradictoires sur le rôle de cette adrénaline du sang, à qui GLEY et QUINQUAUD refusent toute action permanente sur la pression artérielle.

b. Chez le cadavre.

Un point intéressant à signaler, nous aurons l'occasion d'y revenir, est celui de la destinée de l'adrénaline après la mort. Dès les premières recherches, les

auteurs avaient vu que l'adrénaline diminuait chez le cadavre.

BATTELLI [36] le signale pour l'homme et TOUJAN [134] remarque, après 24 heures d'étuve, que le taux d'adrénaline commence à décroître, d'accord en cela avec FOLIN [62] et KURIYAMA [78].

Cependant ZANFROGNINI (d'après TOURNADE [19]) pensait que le taux d'adrénaline ne se modifiait pas chez l'homme dans les premiers jours qui suivent la mort, mais admettait que les chiffres étaient différents suivant que la mort avait été brusque ou précédée d'une longue agonie, qui laisse la surrenale à peu près vide d'adrénaline. CEVIDALLI et LEONCINI [46] avaient même cru pouvoir utiliser cette « *docimasia surrenale* » en médecine légale. Il est vrai que ces auteurs utilisent dans leurs recherches des réactifs non spécifiques, puisque la putréfaction aidant, les réactions de l'adrénaline peuvent « acquérir de l'évidence ».

Comme la question restait controversée, MOURIQUAND et LEULIER [98] eurent recours à la méthode expérimentale. Ils opèrent sur des cobayes asphyxiés au gaz d'éclairage, et constatent qu'après 24 heures l'adrénaline virtuelle est entièrement libérée et que les $\frac{4}{5}$ de l'adrénaline totale ont disparu. D'autres expériences ont été effectuées sur les surrenales humaines par les mêmes auteurs et par GOJON [70]. Au bout de 24 heures, ils ne pouvaient déceler que des traces d'adrénaline.

LANGERON, PAGET et LOHÉAC [81] ont confirmé ces résultats. Mais l'homme est un bien mauvais terrain

d'étude. La surrénale humaine que les chimistes ont entre les mains provient généralement d'un être malade; elle a subi une cadavérisation d'un jour et plus; on ne peut comparer sa teneur en adrénaline à la teneur normale qui est elle-même mal connue.

Aussi LANGERON, PAGET et LOHÉAC ont-ils ensuite expérimenté sur le chien. Sur l'animal venant d'être sacrifié, on prélevait une surrénale et la divisait en deux parties, dans l'une on dosait l'adrénaline libre, et l'autre était préparée pour le dosage de l'adrénaline totale (mise au vide sulfurique pendant 24 heures). L'autre surrénale laissée sur le cadavre subissait après 24 heures les mêmes traitements. On avait ainsi, en supposant que le pourcentage en adrénaline soit exactement le même pour les deux surrénales une idée exacte de l'influence de la cadavérisation sur le taux d'adrénaline libre et d'adrénaline totale.

Voici les chiffres qui concernent l'adrénaline libre (les chiffres d'adrénaline totale sont trop peu nombreux pour avoir quelque intérêt).

Adrénaline 0/00 de glande fraîche :

1° à la mort de l'animal.	0.50	0.30	0.68	0.10	0.40
2° après 24 h. de cadavérisation	0.20	0.20	0.22	0	0.30

L'influence de la cadavérisation sur la teneur en adrénaline des surrénales paraît donc définitivement établie. On peut en tirer de nombreuses conclusions; la docimasie surrénale repose sur une erreur; la préparation des produits opothérapiques surrénaux

exige des conditions particulières de rapidité (LEULLIER et GOJON [84]) que nous avons retenues dans les expériences que nous allons bientôt décrire. Pour avoir une idée plus proche de la réalité de la teneur en adrénaline des surrénales, il faut opérer vite, à l'abri des ferments et de l'air.

CHAPITRE II

RECHERCHES CHIMIQUES PERSONNELLES SUR L'ADRÉNALINE DES CAPSULES SURRÉNALES DES MAMMIFÈRES

Après avoir passé en revue les travaux nombreux suscités par la biochimie de l'adrénaline et après avoir analysé les opinions souvent contradictoires émises à son sujet, il est facile de voir que nos connaissances offrent plus d'une imprécision. En particulier les idées restent dissemblables, sinon opposées en ce qui concerne les origines et les destinées de l'adrénaline.

Sans envisager tout le problème, nous avons essayé de résoudre les questions ci-après : l'adrénaline est-elle d'origine médullaire ou corticale ? est-elle totalement libre dans la surrénale ? Subit-elle chez l'animal sain d'importantes variations d'un individu à un autre et d'une espèce à l'autre ?

A. ETUDE CRITIQUE DES METHODES CHIMIQUES DE DOSAGE

Pour évaluer le taux de l'adrénaline des surrénales, nous avons choisi une méthode colorimétrique basée

sur la réaction de l'adrénaline avec le sublimé en présence d'un acide faible, connue sous le nom de méthode de BAILLY [31].

Une méthode de dosage de l'adrénaline dans la surrénale compte fatalement deux stades :

1°) l'extraction;

2°) le dosage proprement dit.

L'extraction doit être complète et cependant pas trop longue pour ne pas donner lieu à une destruction partielle d'adrénaline. Le dosage colorimétrique final, qui s'opère par comparaison avec une solution étalon, doit être basé sur une réaction colorée spécifique, sensible et rigoureusement proportionnelle en intensité aux quantités d'adrénaline mises en jeu.

C'est pour vérifier si ces conditions étaient réalisées que nous avons étudié, de façon détaillée, notre réaction de base, en la comparant principalement à la méthode utilisée par ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN [23].

I. Critique de la méthode à l'iode

(ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN).

La méthode qui utilise l'iode pour oxyder l'adrénaline en produisant une réaction colorée se prêtant au dosage est déjà ancienne. Tandis que TOUJAN [134] faisait disparaître l'excès d'iode par l'hyposulfite, SCHUR (d'après BARGER [33]) utilisait l'éther à la même fin. KRAUSS (d'après BARGER [33]) remplace l'iode par l'acide iodique, d'autres par l'iodate de potassium en présence d'acide phosphorique. De

plus, BAYER [39] sensibilise la méthode en faisant la réaction en présence d'acide sulfanilique.

De toutes ces modifications, aucune n'a été employée, hormis celle d'ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN, à une étude systématique de l'adrénaline. C'est donc la méthode à l'iode d'ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN qui fera d'abord l'objet de notre examen critique.

1. TECHNIQUE DE LA MÉTHODE A L'IODE.

TOUJAN [134] opère de la façon suivante :

On fait macérer 24 gr. de surrénales à $+41^{\circ}$ dans l'eau salée et saturée de chloroforme, *pendant 24 heures*. Le produit additionné de 5 gouttes d'acide chlorhydrique au 1/10 est dilué à 250 cc, porté à l'ébullition et filtré. 20 cc du filtrat sont additionnés de 5 cc de solution d'iode décinormale; après un repos de 15 minutes, on verse suffisamment de solution d'hyposulfite pour éliminer l'excès d'iode. On complète à 50 cc, filtre et colorimètre en comparaison d'une solution témoin : solution d'adrénaline au 1/10.000 fraîchement préparée et contenant, pour un même volume, la même quantité d'acide chlorhydrique que le liquide à analyser.

Il faut colorimétrer en lumière artificielle : la coloration est stable 3 à 4 heures.

2. ESSAI DE LA MÉTHODE EN SOLUTION PURE.

Avant d'appliquer la méthode au liquide de macération des surrénales, nous l'avons employée pour le dosage de l'adrénaline en *solution pure*.

Nous avons été surpris de voir que la solution d'adrénaline au 1/10.000 dans l'acide sulfurique centinormal et traitée par l'iode décinormal ne donnait, après l'action de l'hyposulfite, qu'une *légère coloration rose disparaissant assez rapidement*.

Il nous est bientôt apparu que plusieurs facteurs modifiaient cette réaction : la concentration de l'iode et le temps que dure son action, la quantité d'hyposulfite et surtout l'acidité des deux solutions sont autant de facteurs qui influent sur la stabilité, la sensibilité, la proportionnalité de la réaction.

a) Alors que l'iode décinormal ne donne qu'une teinte pâle, le même volume de solution d'iode centinormal donne une belle coloration rose, et cela pour la même quantité d'adrénaline.

Mais, fait important, le maximum d'intensité obtenu dans ces conditions, n'est guère plus intense que la coloration rouge donnée par la réaction de BAILLY avec une solution contenant *moins* d'adrénaline.

Nous avons vérifié que le maximum d'intensité existe, pour une expérience donnée, lorsque l'action de l'iode s'est prolongée de 12 à 15 minutes. Par contre, cette coloration n'est pas stable pendant 4 heures, comme le disait TOUJAN. En effet, en quelques instants, les colorations vives disparaissent et l'on a tout juste le temps de colorimétrer. BAYER [39] avait déjà fait une critique analogue à cette même méthode.

b) TOUJAN recommande d'éliminer l'iode par l'hyposulfite, dont un excès ne serait pas nuisible. Nous avons constaté le fait, mais la coloration est alors

encore plus fugace et la réaction moins sensible.

c) Le facteur le plus important est le facteur *acidité*. L'oxydation de l'adrénaline, retardée par de petites quantités d'acide, est empêchée par des quantités plus élevées. D'après TOUJAN, lorsque la solution contient le 1/100 de son volume d'acide chlorhydrique, la coloration ne se produit plus. Aussi, soit que l'on utilise la méthode à l'iode, soit toute autre méthode d'oxydation, il faut absolument se tenir dans des limites très étroites d'acidité et, en tous cas, toujours identiques pour le liquide témoin et pour le liquide à doser.

Lorsque la réaction est effectuée dans les meilleures conditions, avec un minimum d'acidité égale pour la solution et le témoin, avec une quantité optimale d'iode centinormal agissant 15 minutes, et un volume égal d'hyposulfite de soude centinormal, la *sensibilité* va jusqu'au 1/1.000.000. Cependant on ne peut songer à colorimétrer au delà du 1/100.000.

Mais, et c'est là une grave critique, il n'y a de proportionnalité entre la quantité d'adrénaline et les intensités de coloration qu'autant que l'iode est employé en quantité définie mais variable avec la *quantité d'adrénaline*, ainsi qu'il ressort du tableau suivant :

Adrénaline au 1/10.000	2	2	2	2	2 cc		2	2
Iode N/100	V	X	XV	1 cc	2 cc	Iode N/10	1 cc	2 cc
S ² O ³ Na ² N/100	V	X	XV	1 cc	2 cc	S ² O ³ Na ² N/10	1 cc	2 cc
Eau Q. S. pour compléter à 10 cc.								
Chiffre du colorimètre	32	20	18	16	16		25	30

Suivant la concentration en adrénaline, il faut employer plus ou moins d'iode et cela enlève toute valeur à la méthode.

3. ESSAI D'APPLICATION DE LA MÉTHODE AU DOSAGE DE L'ADRÉNALINE DANS LES EXTRAITS SURRÉNAUX.

Que penser alors de l'application de la méthode au dosage de l'adrénaline dans les extraits surrénaux et d'abord que penser de l'extraction de l'adrénaline selon ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN ?

a) On ne saisit pas l'intérêt que l'on a d'extraire l'adrénaline de 24 grammes de glandes, puisqu'on a à peine besoin d'un dixième de cette quantité pour le dosage colorimétrique. Mais, observation plus grave, TOUJAN réalise l'extraction à l'étuve à 41° pendant 24 heures : cette durée est trop longue et ceci entraîne l'altération d'une partie de l'adrénaline, même en milieu chloroformé. MOURIQUAND et LEULLIER [99] par la méthode de BAILLY ont montré qu'à froid, en solution chloroformique, non acide il est vrai, l'adrénaline disparaît en 48 ou 72 heures. Nous même avons noté, tant par la réaction à l'iode que par la réaction au sublimé, qu'une macération de 30 minutes donne des résultats plus élevés qu'une macération de 24 heures, dans les conditions définies par TOUJAN. En effet, les réactions colorées attestent après 24 heures, une diminution de l'adrénaline.

	A la mort de l'animal		Après séjour à l'étuve à 41° pendant 24 h.	
	iode	sublimé	iode	sublimé
Corticale bœuf ...	0.62	0.50	0.50	0.30
Glande { veau 1 .	1.60	1.52	1.40	1.05
entière } veau 2 .	1.51	1.55	1.35	1.20

Puis, si l'on prolonge davantage ce temps de macération, les résultats des deux méthodes divergent, les chiffres de la méthode à l'iode augmentent, tandis que ceux de la méthode de BAULLY diminuent considérablement (1).

b) Les liquides de macération désalbuminés donnent avec l'iode décinormal (*contrairement à ce qui se passe pour les solutions pures d'adrénaline*) une très belle coloration rose-rouge. L'iode centinormal donne d'ailleurs, à volume égal, des intensités analogues.

Ces intensités, pour un même extrait, *sont proportionnelles au volume* du liquide d'extraction.

La réaction est-elle *spécifique* ? Elle ne semble rien donner avec divers extraits opothérapiques que

(1) TOUJAN a d'ailleurs donné une autre technique d'extraction de l'adrénaline des surrénales. Dans une note à la Soc. Biol., note qui est contemporaine de la thèse de TOUJAN, ABÉLOUS, SOULIÉ et TOUJAN [23] pratiquent une « extraction, extemporanée » : 10 gr. de capsules de mouton, broyées avec du sable sont traitées à l'eau salée, bouillie et maintenue à 40-50°. On ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique et fait bouillir quelques minutes. Ce mode opératoire, on en conviendra, manque de précision. Cependant les résultats qu'il donne sont les chiffres d'adrénaline libre d'ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN, c'est-à-dire les chiffres de base auxquels sont comparés les chiffres de murissement.

nous avons essayés : poudre d'ovaire, extrait entérique, splénique, hépatique, hypophysaire; mais beaucoup d'auteurs ont reproché à cette méthode sa non spécificité : BAYER [39] croit qu'elle décèle divers corps et en particulier des acides aminés, produits dans la putréfaction.

Nos recherches personnelles apportent une confirmation nette de l'influence des phénomènes de décomposition. En effet, si on maintient des lots de surrénales, en milieu chloroformique et acide, on constate par la méthode à l'iode qu'au bout de 5 jours, alors que se manifestent des signes évidents de putréfaction, ces lots donnent des chiffres beaucoup plus élevés que ceux fournis au dosage immédiat, ou au dosage après 24 heures à partir de lots identiques.

Méthode à l'iode	A la mort de l'animal	Après 24 h.	Après 5 jours
Corticale bœuf ...	0.62	0.50	0.44
Glande { veau 1 ..	1.60	1.40	2.25
entière { veau 2 ..	1.51	1.35	2.58

Les chiffres ci-dessus, nous dispensent de tout autre commentaire.

II. Critique de la méthode de Cannon, Folin et Denis [62]

Cette méthode décrite en 1912 est basée sur la réaction que donnent tous les polyphénols et bien d'autres corps avec l'acide phosphotungstique. La colora-

tion bleue est pour l'adrénaline d'une exquise sensibilité, dépassant le 1/3.000.000, mais le manque de spécificité de la réaction est une cause d'erreur importante. Le même réactif utilisé couramment à la détection et au dosage de l'acide urique peut conduire à des mécomptes : LEWIS [88] signale la présence d'acide urique, en quantité très appréciable, dans les capsules surrénales de fœtus.

Malgré ce manque de spécificité, nombreux sont les auteurs qui ont utilisé cette méthode. FOLIN, CANNON et DENIS comparent les résultats qu'elle donne à ceux de la méthode physiologique et les estiment extrêmement voisins.

Bien que cette opinion ait été discutée (SUGAWARA [130], WATANABE et SATO [144]) c'est encore actuellement une des méthodes colorimétriques les plus employées à l'étranger.

III. Critique de la méthode de Bailly [31]

C'est COMESSATTI [51], qui utilisa le premier en 1909, le bichlorure de mercure comme catalyseur d'oxydation de l'adrénaline. Mais BOAS, FRANKEL et ALLERS (1909) ne purent obtenir la réaction aussi aisément parce que ces auteurs employaient l'eau distillée, tandis que COMESSATTI utilisait l'eau potable, qui est naturellement chargée de bicarbonate de calcium (EWINS, 1910). VULPIAN [143] avait déjà remarqué que l'oxydation se fait plus rapidement dans l'eau potable que dans l'eau distillée. Aussi EWINS [58] pour se placer toujours dans des condi-

tions identiques, préconisa-t-il l'acétate de sodium, sel d'acide faible qui remplace le bicarbonate de calcium des eaux naturelles (HUGOUNENQ). La réaction au sublimé et à l'acétate de sodium que GRIMBERT et LECLÈRE [71] avaient utilisée à la caractérisation de l'apomorphine, et DENIGÈS [56] à la détection de l'adrénaline, a été adaptée par BAILLY [31] au dosage colorimétrique de cette base dans les poudres de surrénales.

1. TECHNIQUE DE LA MÉTHODE AU SUBLIMÉ.

BAILLY préconise la technique suivante :

a) Introduire successivement dans une fiole jaugée de 100 cc.

Poudre de surrénale	1 gr.
Acide sulfurique N	1 cc.
Eau distillée	5 cc.

Laisser macérer 15 minutes en ayant soin d'agiter fréquemment. Compléter à 100 cc. avec une quantité suffisante d'eau distillée et laisser environ 15 minutes en contact, en agitant de temps en temps; filtrer.

b) D'autre part, introduire dans un tube à essai :

Acétate de sodium	1 gr.
Eau distillée	8 cc.

faire dissoudre et ajouter :

filtrat ci-dessus	2 cc
-------------------------	------

mélanger et ajouter :

solution de sublimé à 5 p. 100	III gouttes
-------------------------------------	-------------

mélanger à nouveau.

Il ne tarde pas à apparaître une belle coloration

rouge qui atteint son maximum d'intensité au bout de trois minutes environ et qui est même suffisamment intense et stable pour se prêter à un dosage colorimétrique par comparaison avec la solution d'adrénaline suivante, dont le titre est connu :

Adrénaline pure au 1/10.000 en solution récente
dans l'acide sulfurique N/100 2 cc.

Eau distillée 8 cc.

que l'on traite dans les mêmes conditions que précédemment.

Telle est la méthode, à de légères modifications près, utilisée notamment par MOURIQUAND, LEULIER et GOJON, et par LOHÉAC, dans leurs recherches.

Elle est aujourd'hui préconisée en France où elle ne tardera sans doute pas à devenir officielle, puisqu'elle est proposée par la sous-commission du Codex [50]. Elle apparaît comme le procédé de travail, sinon le plus exact, du moins le plus pratique et le seul intéressant lorsque de nombreux dosages sont nécessaires.

2. ESSAI DE LA MÉTHODE AU SUBLIMÉ SUR DES SOLUTIONS PURES D'ADRÉNALINE.

Cependant, pour donner plus de garanties à nos recherches nous avons voulu éprouver sa valeur. Avant de l'appliquer aux extraits surrénaux complexes, nous l'avons d'abord essayée sur des *solutions pures* d'adrénaline.

Nous avons utilisé une solution d'adrénaline au 1/10.000 dans l'acide sulfurique centinormal, c'est-à-

La coloration n'apparaît immédiatement que dans le tube témoin et successivement dans les 6 autres tubes. Ce n'est qu'après une demi-heure que le tube 6 commence à rosir, on a alors une belle gamme allant du rouge au rose pâle.

Nous donnerons une autre expérience qui précise plus exactement le rôle du facteur acide : les chiffres du colorimètre y correspondent à chaque degré d'acidité, ainsi, après 10 minutes, on avait les résultats suivants :

Solution T ..	2	2	2	2	2	2	2
SO ⁺ H ² N/10 ..	0	1	II	V	X	XX	2 cc.
Eau distillée							
Q. S. pour 10 cc.							
Chiffre du							
colorimètre ..	10	12.8	14.5	15	15.5	21	26

Le facteur acide retarde donc très nettement l'oxydation. En milieu très acide, les phénomènes d'oxydation sont presque nuls.

Nous avons vu précédemment que le fait avait été signalé par nombre d'auteurs. BOULUD et FAYOL [42] à propos de la méthode de BATTELLI, TOUJAN [134] à propos de la méthode à l'iode, FOLIN, CANNON et DENIS pour la méthode phosphotungstique [62], insistent vivement sur ce point. VACEK [137] étudie spécialement la question et compare le degré d'oxydation et le degré de dissociation des acides. L'oxydation de l'adrénaline paraît variable selon la provenance de l'adrénaline et la nature de l'acide. Elle n'est en tous cas pas en rapport direct avec le pH des divers acides, mais pour un même acide VACEK

observe un parallélisme entre le degré d'oxydation et la dilution.

En forme de conclusions, il faut toujours employer le même acide, en solution suffisamment diluée, et rechercher pour cette dilution, toujours la même, à quel moment l'intensité de coloration est maxima.

La **durée** est un second facteur. Le maximum d'intensité n'est pas atteint immédiatement et garde une stabilité relative.

La solution T (adrénaline au 1/10.000 dans l'acide sulfurique N/100) donne une coloration rouge dont l'intensité maxima apparaît en 3 à 5 minutes, et reste stable une dizaine de minutes. Ensuite elle faiblit doucement; au bout de 30 minutes, elle a perdu 10 à 15 p. 100 de son intensité. Aussi, ne faut-il pas utiliser un tube témoin mis en expérience depuis plus de 15 minutes.

Voici en effet ce que donne un témoin après des temps variables et comparé à un témoin renouvelé :

Témoin après	Témoin après		
5'	30'	1 h.	1 h. 30
20	23		
20	21	26	32

Enfin, la solution type ne devra jamais contenir de *stabilisateurs*, comme le métabisulfite de soude, le formol, l'hyposulfite de soude, l'acide oxalique, tous réducteurs qui inhibent l'oxydation de l'adrénaline (GOJON [70]).

Pour opérer ensuite les dosages dans des condi-

tions toujours identiques, nous avons obtenu notre solution T à partir d'une solution mère d'adrénaline au 1/1000 dans l'acide sulfurique décinormal, solution de facile conservation. Le liquide témoin, qui est une solution d'adrénaline dans l'acide sulfurique N/100, s'altère assez rapidement (il perd jusqu'à 10 p. 100 de son adrénaline en 4 jours), il sera renouvelé à chaque série de dosages.

c) Ainsi effectuée, la réaction de BAILLY présente une *sensibilité* et une *exactitude* suffisantes.

1° Elle permet de déceler près d'un millionième d'adrénaline, mais elle n'est applicable qu'à partir d'une solution contenant au moins 1/100.000 d'adrénaline.

2° On observe un parallélisme entre l'intensité de coloration et la teneur en adrénaline. Maintes fois ce caractère a été vérifié, et les très rares à coups rencontrés sont à mettre sur le compte de l'inobservation des conditions signalées précédemment.

En règle générale, il y a une exactitude presque parfaite, et d'ailleurs pour nous mettre à l'abri de toute cause d'erreur, nous avons régulièrement fait deux témoins, de concentration différente en adrénaline : la correspondance entre intensité et teneur en adrénaline a été régulièrement observée.

3. APPLICATION DE LA MÉTHODE AU SUBLIMÉ AU DOSAGE DE L'ADRÉNALINE DANS LES EXTRAITS SURRÉNAUX.

Ainsi la technique de BAILLY présente un réel intérêt lorsqu'il s'agit de solutions pures d'adrénaline,

dont le degré d'acidité est connu. Nous allons voir quelles sont les conditions expérimentales à remplir dans le cas du *dosage de l'adrénaline dans les glandes surrénales fraîches*.

a) Extraction. Il faut tout d'abord extraire l'adrénaline, complètement et sans l'altérer. Seul un milieu acide est capable d'effectuer une solubilisation complète de l'adrénaline, tout en évitant son oxydation.

Deux facteurs ont été envisagés : la quantité d'acide à employer et la durée de l'extraction.

Le premier est facile à résoudre. La réaction est optima pour une faible acidité (nous avons adopté l'acide sulfurique centinormal) et cette acidité sera *en tous cas égale pour le tube témoin et le tube en expérience*.

Comme BAILLY, nous avons fixé la durée de l'extraction à 30 minutes. Plusieurs expériences nous ont en effet montré qu'au bout de ce temps, l'extraction est complète, et que l'adrénaline commence à diminuer au-delà de cette durée.

Les chiffres suivants en sont une preuve : sur un liquide d'extraction d'une surrénale de mouton, on dose l'adrénaline après 30 minutes, 5 heures, 24 heures de contact. Les chiffres du colorimètre indiquent clairement une perte de 10 %, après une extraction de 24 heures.

Durée de la macération	Chiffres du colorimètre	
	Témoin	Extrait
30'	20	24.8
5 h.	20	25.5
24 h.	20	27.5

b) Dosage. Le liquide extractif est un milieu complexe. La réaction de Bailly ne va-t-elle pas être modifiée ?

1. Les *réactifs* agissent sur l'extrait filtré, incolore, comme sur la solution T. Le sublimé donne un louche, suivi d'un trouble après quelques minutes; aussi fera-t-on précéder le dosage au colorimètre d'une centrifugation ou d'une filtration.

2. L'influence du facteur *acidité* est réglée puisqu'on se trouve dans les mêmes conditions pour le témoin et l'extrait, tous les deux en solution sulfurique centinormale.

Au contraire le facteur « *durée* » n'est pas le même pour la solution témoin et l'extrait de surrénale fraîche.

Lorsqu'il s'agit de la solution pure d'adrénaline, ou d'extraits obtenus à partir de surrénales fraîches ayant subi l'action du vide ou d'une température élevée, ou bien de poudre de surrénale du commerce, le maximum d'intensité est atteint en 3 à 5 minutes. Au contraire, l'extrait de surrénale fraîche ne l'acquiert qu'après 25 à 30 minutes.

MANCEAU [94], LEULIER et GOJON avaient déjà noté cette différence de comportement entre la surrénale fraîche et la solution témoin, ou la poudre de surrénale.

Aussi ne faut-il colorimétrer qu'après 25 à 30 minutes, et, en raison du manque de stabilité des colorations, *le témoin ne peut être mis en train qu'avec un décalage d'au moins 20 minutes sur l'extrait, de façon à comparer deux intensités maxima*

Au contraire, la pulpe surrénale ayant subi une *action physique*, comme celle du vide, de la chaleur ou du froid, se comporte comme la solution témoin, ou les poudres surrénales. Son maximum d'intensité est atteint en 3 à 5 minutes : la coloration faiblit ensuite rapidement, ainsi que le prouvent les chiffres suivants qui se rapportent à une pulpe ayant subi l'action du vide sec pendant 24 heures.

Lecture après	Adrénaline 0/00 de médullaire			
	I	II	III	IV
5'	8.30	8.38	7.40	7.20
15'	7.65	7.82	5.70	5.40
30'	4.30	5	4.10	4.30

Le fait est intéressant à signaler : les auteurs qui ont étudié l'adrénaline virtuelle par la méthode de BAILLY (MOURIQUAND, LEULIER et GOJON [70], PAGET et LOHÉAC [114]) ne l'avaient pas remarqué. L'apparition très rapide de la coloration nous donnera un argument permettant d'étayer notre opinion sur l'état de l'adrénaline virtuelle.

3° L'emploi de la réaction de BAILLY comme méthode de dosage de l'adrénaline dans la surrénale est dominé par la question de la **spécificité** de la réaction.

Certains l'ont accusée de manquer de spécificité. (MOLINELLI et MAZZOCCO [95]) et c'est pourquoi la notion d'adrénaline virtuelle de MOURIQUAND et LEULIER a rencontré des adversaires sous le prétexte que cette conception reposait sur les chiffres donnés par

la méthode de BAILLY, MOLINELLI et MAZZOCCO [95] réfutent donc les conclusions de MOURIQUAND et LEULIER : « il est évident, écrivent-ils, que par ce procédé l'intensité de la coloration n'est point due après 24 heures à la libération d'adrénaline, *mais qu'elle est liée à la présence d'une substance formée dans ces conditions* ».

— MOURIQUAND et LEULIER [103] ont essayé la méthode de BAILLY sur une foule de substances organiques dont la plupart sont susceptibles de prendre naissance au cours de la putréfaction. Les solutions pures de toute une série de corps : tyrosine, alanine, phénylalanine, ornithine, histidine, tryptophane, bétaine, lysine, proline, cadavérine, leucine, créatine, cystine, sarcosine, arginine, sérine, valine, méthylguanidine, ainsi que les diphénols, pyrocatéchine, résorcine, hydroquinone, donnent ou bien une réaction de BAILLY négative, c'est-à-dire aucune coloration, ou bien des colorations diverses, sans rapport aucun avec celle que présente l'adrénaline.

— De même encore, les macérations de divers tissus (hépatique, splénique, rénal, entérique, hypophysaire, ovarien) frais ou desséchés pendant 24 heures n'ont donné aucune coloration par la méthode de BAILLY. MOURIQUAND et LEULIER [103] l'ont signalé, et nous l'avons à nouveau noté nous-même.

Sans doute, ne peut-on apporter qu'un faisceau de preuves négatives, mais elles nous ont paru suffisantes pour étayer la spécificité de la méthode. « Aucun fait chimique n'est venu infirmer cette réaction » (MOURIQUAND et LEULIER [103]) qui doit être considé-

rée, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, comme caractéristique de l'adrénaline.

— Bien plus, cette méthode n'est certainement pas influencée par les produits de la putréfaction, puisqu'elle permet de suivre la disparition progressive de l'adrénaline dans la cadavérisation expérimentale (MOURIQUAND et LEULIER [99], LANGERON, PAGET et LOHÉAC [81]). Des expériences nouvelles nous ont permis de nous en rendre compte et de signaler qu'il en est tout autrement pour la méthode à l'iode. Nous résumons toutes nos observations à ce sujet dans le tableau suivant; elles concernent des lots de capsules identiques, conservés plus ou moins longtemps en milieu chloroformé et acide.

	A la mort de l'animal		Après séjour à l'éuve à 41° dans l'eau physiolo- gique chloroformée acidulée pendant				Après séjour de 24 h. dans le vide sec	
			24 h.		5 jours			
	iode sublimé		iode sublimé		iode sublimé		iode sublimé	
Corticale								
Bœuf	0.62	0.50	0.50	0.30	0.44	0	0.45	0.40
Glande ent.								
Veau	1.60	1.52	1.40	1.05	2.25	0.70	2.80	2.70
Glande ent.								
Veau	1.51	1.55	1.35	1.20	2.58	1.11	1.75	1.85

Variations du contenu adrénalinique des surrénales sous l'action de la chaleur douce et prolongée et du vide sec. Comparaison des résultats de la méthode à l'iode et de la méthode au sublimé.

Comme nous l'avions fait pour une solution pure, nous avons vérifié, pour les extraits, la *sensibilité* de la réaction et son *exactitude*. Ces caractères sont très *satisfaisants*.

Une fois en possession de tous ces facteurs et connaissant le déterminisme de la méthode de BAILLY, nous l'avons appliquée au dosage de l'adrénaline dans diverses circonstances. Elle nous a permis au cours de nombreuses expériences d'étudier étroitement non seulement la répartition de l'adrénaline dans la capsule surrénale des Mammifères, mais encore la libération de l'adrénaline surrénale après la mort.

3. APPLICATION DE LA METHODE DE BAILLY AU DOSAGE DE L'ADRENALINE LIBRE ET VIRTUELLE

Nous avons dosé l'adrénaline dans les deux zones distinctes des surrénales de divers Mammifères : nous avons voulu évaluer non seulement l'adrénaline décelable à la mort de l'animal, mais encore l'adrénaline masquée qui n'est libérée qu'après la mort.

1. Moyens de libération de l'Adrénaline virtuelle

L'adrénaline libre se prête facilement à l'extraction et au dosage, tandis qu'il est nécessaire de *libérer préalablement l'adrénaline masquée*.

Le problème est délicat : l'instabilité de l'adrénaline entre en jeu, il faut éviter que le moyen de libération employé ne dépasse le but qu'on lui a fixé et ne devienne directement ou indirectement un facteur de destruction de l'adrénaline.

1. L'ACTION DU VIDE PROFOND ET SEC LIBÈRE
PARFAITEMENT L'ADRÉNALINE VIRTUELLE.

Un moyen physique qui remplit parfaitement le double but de « libérer sans détruire » l'adrénaline virtuelle est le *vide profond sec*, préconisé par MOURIQUAND et LEULIER [96]; les expériences nombreuses où nous l'avons utilisé, soit seul, soit comparativement à d'autres moyens physiques, nous permettent de conclure que le vide sec, prolongé 24 heures, libère entièrement l'adrénaline virtuelle, et *évite toute putréfaction*, source principale d'erreur.

En effet, si l'on prolonge l'action du vide 48, 72 heures (exp. VIII) et même 4 et 5 jours, le contenu adrénalinique n'augmente plus, mais a tendance à diminuer. C'est donc bien au bout de 24 heures que la surrénale est la plus riche en adrénaline.

Lorsque le vide n'a pas été suffisant, le chiffre d'adrénaline totale est plus faible que celui d'adrénaline dite libre. Lorsque la mise en train a été longue, le premier dosage donne un chiffre correspondant à l'adrénaline libre et à une partie de l'adrénaline virtuelle et le chiffre final de celle-ci diminue d'autant. La différence entre les deux chiffres est faible : elle correspond à l'adrénaline *encore* masquée au moment du premier dosage.

*Effets de quelques agents physiques sur le mûrissement
de l'adrénaline dans la zone corticale.*

	Dosage immé- diat	Froid (glacière 24 h.)	Chaleur				Vide		
			100°		20° à 85°		24 h.	48 h.	72 h.
			1 h.	2 h.	DI	VIDE			
Mouton									
IV	0.19	0.10	0.13				0.10		
	0.18	0.10	0.14				0.10		
VI	ind.		ind.			ind.	ind.		
	ind.		ind.			ind.	ind.		
X	0.14		0.15				0.15		
Bœuf									
XXVIII	0.93	ind.	ind.				0.25		
	0.60	ind.	ind.				ind.		
Veau									
XXX	0.66		0.42				0.56		
	0.59		0.54				0.52		
Cheval									
LV	0.20		ind.			ind.	ind.		ind.
	0.12		ind.			ind.	ind.		ind.
LVI	0.40		ind.			ind.	ind.	ind.	
	ind.		ind.			ind.	ind.	ind.	

Nota. — Pour permettre de comparer la teneur en adrénaline de la corticale et de la médullaire d'un même lot de surrénales, chaque lot a été numéroté, et les tissus médullaires ou corticaux qui en sont issus portent le même numéro.

— Lorsque les lots ont subi l'action de la *chaleur*, les abréviations DI, exsicc., VIDE, signifient qu'au sortir de l'étuve les dosages ont eu lieu aussitôt (DI), ou bien après un séjour de 24 heures dans l'exsiccateur (exsicc.) ou dans le vide (VIDE).

— Le terme indosable (ind.) signifie : moins de 0.10 ctgr. adrénaline pour 1000 gr. de tissu frais.

*Effets de quelques agents physiques sur le mûrissement
de l'adrénaline dans la zone médullaire.*

	Dosage immé- diat	Froid (glacière 24 h.)	Chaleur				Vide		
			2 h.	20° à 85°		VIDE	24 h.	48 h.	72 h.
			100°	DI	exsicc. 24 h.				
Mouton									
IV	{ 3.29 3.33	3 3.45	3.50 2.82				3.63 3.55		
V	{ 3.10 3	3.24 3.22	2.92 2.73				3.67 4.02		
VI	{ 4.38 4.44		4.13			4.13 4.63	4.57 5.45		
VII	{ 3.05 3.57			7.20 7.40		5.70 5.40	8.30 8.80	6.80 6.85	
VIII	{ 5.28 5.28			4.76 5.40	5.65 5.29	6.64 6.62	6.53 6.62	6.30 5.50	5.12 5.17
				7.40			5.66		
					48 h.				
					5.65	5.70			
IX	4.82			9.88	4.91	5.66	7.70		
X	4.78			9.61			8.06		
Bœuf				5.10			5.77		
XXVIII	{ 5.92 5.60	4.76 5.10	4 4.45				5.30 5.48		
XXIX	{ 6.50 5.48	7.53 6.32	5.49 6.70				8.88 8.85		
Veau									
XXX	{ 5.45 6.49			6.86 7.36		6.66 6.08	7.72 7.40		
XXXIII	5.88			6.94		8.06	6.66		
				6.57		8.33	9.43		
XXXIV	{ 6.32 5.74			8.22 7.70			8.01		
Porc									
XLI	3.47			4.96			4.53		
				4.48			5		
Cheval									
LV	{ 4.87 4.90				6.89 7.20		9 7.03		8.60 7.40
LVI	{ 5.19 5.80				5.30 6.50		7.27 8.28	5.30 6.66	

Si le vide a été mauvais et la mise en train longue, le chiffre final d'adrénaline est bien plus faible que celui de l'adrénaline libre : il y a eu à la fois mûrissement avant le premier dosage, et destruction de l'adrénaline avant le second.

C'est l'inconvénient d'un vide accidentellement imparfait, comme aussi celui d'attendre 24 heures pour mesurer l'adrénaline totale qui nous a conduit à rechercher un autre moyen de libération de l'adrénaline.

2. LA CHALEUR, UTILISÉE DANS CERTAINES CONDITIONS, LIBÈRE L'ADRÉNALINE VIRTUELLE.

L'action de la chaleur a déjà été utilisée par ABELOUS, SOULIÉ et TOUJAN [25] : c'est en maintenant les surrénales à 41° pendant 24 heures, que ces auteurs eurent pour la première fois des signes d'ailleurs fallacieux de mûrissement. Nous avons vu plus haut ce que l'on pouvait penser du procédé : l'adrénaline disparaît peu à peu. Les chiffres élevés que fournit alors la méthode à l'iode ne peuvent être considérés que comme des témoins de la cadavérisation.

Nous avons essayé de diminuer la durée du séjour à l'étuve en augmentant la température :

a) Si l'on place des lots de médullaire et de corticale à l'étuve à 100° pendant 2 ou 4 heures, on trouve après ce traitement des chiffres d'adrénaline moins élevés qu'auparavant (expériences IV, V, VI, XXVIII, pour la médullaire, expériences IV, VI

XXVIII pour la corticale). L'adrénaline ne résiste pas dans ces conditions à l'action de la chaleur intense et prolongée.

b) Au contraire, un séjour de 20 minutes à l'étuve à 85° donne un chiffre d'adrénaline généralement supérieur à celui de l'adrénaline primitive et parfois comparable au chiffre d'adrénaline totale du vide-sec. Ainsi les médullaires de mouton (VII, VIII, IX, X), de veau (XXX, XXXIII, XXXIV), de porc (XLI), présentent un mûrissement important, dépassant parfois celui que donne le vide.

Cependant le chiffre après étuve est généralement plus faible que celui après vide. Aussi avons-nous voulu savoir si la différence provenait d'un mûrissement incomplet ou d'une destruction à l'étuve. Pour ce faire, la prise d'essai ayant subi l'action de l'étuve à 85° pendant 20 minutes est mise au vide sulfurique pendant 24 heures. Les résultats obtenus sont discordants; il y a tantôt une nouvelle augmentation parfois très élevée (médullaires VI, VIII, XXIII) tantôt une diminution (médullaires VII, XXX).

Au sortir de l'étuve, nous avons parfois introduit les lots dans un simple exsiccateur à acide sulfurique. Après séjour de 24 heures dans l'air sec, il y a un chiffre plus faible d'adrénaline (expériences VIII, LV, LVI). MOURIQUAND et LEULIER [100] en signalant l'influence de l'air sec sur la disparition de l'adrénaline, avaient souligné l'importance d'un vide profond, tant pour la conservation, que pour le mûrissement des surrénales.

Comme conclusion à cette étude de l'action de la

chaleur sèche sur le mûrissement, il apparaît que cette action est certaine et permet en quelques minutes de mettre en évidence l'adrénaline virtuelle, en utilisant la même solution titrée d'adrénaline au 1/10.000 qui a servi au dosage de l'adrénaline immédiate, tandis qu'après l'action du vide, 24 heures se sont écoulées et il vaut mieux renouveler la solution témoin.

Comme contre partie, il faut bien dire que ce procédé est moins régulier que le procédé du vide et il faut admettre, soit que l'adrénaline n'est pas totalement libérée, soit qu'elle est détruite en partie.

3. LE FROID NE LIBÈRE QU'IRRÉGULIÈREMENT L'ADRÉNALINE VIRTUELLE.

Enfin, nous avons essayé de conserver les surrénales à basse température : à -5° , la libération de l'adrénaline a lieu comme à température ordinaire, et on pourrait croire que les causes d'altérations sont limitées dans ces conditions (exp. IV, V, XXIX).

Cependant les résultats ne sont guère satisfaisants; aussi n'avons-nous pas poussé plus loin cette étude.

Pour résumer, *l'action du vide sec, profond et durant 24 heures demeure le moyen de choix pour l'étude générale du phénomène de mûrissement.*

II. Technique complète de dosage de l'adrénaline libre et virtuelle.

Après avoir fait ces remarques diverses, nous donnons la *technique exacte que nous avons suivie*, tant pour le dosage de l'adrénaline immédiate que pour

celui de l'adrénaline totale, et par différence, de l'adrénaline virtuelle.

1) Les capsules, *prélevées* dès la mort de l'animal sont rapidement disséquées. Sur chaque lot homogène de médullaire et de corticale on effectue 4 prises d'essai de 0,40 à 1 gr. et plus (celles de corticale dépassaient toujours 1 gr.). Deux sont destinées au dosage immédiat « D. I. » et mises en train aussitôt; les deux autres qui subissent l'action du vide « VIDE » avant le dosage, sont placées dans le Scheibler dès après la pesée.

2) *L'extraction* de l'adrénaline se fait sensiblement dans les mêmes conditions avant ou après l'action du vide.

La prise d'essai est broyée avec 2 à 3 fois son poids de sulfate de soude anhydre, et introduite dans une éprouvette de 20 cc en même temps que 2 cc d'acide sulfurique décimal et 8 cc d'eau distillée. A l'aide d'un agitateur on facilite la dissolution. Après 15 minutes, on complète à 20 cc avec de l'eau distillée et on agite à nouveau le mélange. 30 minutes après le début de l'opération, l'extraction de l'adrénaline libre est complète, on filtre sur un filtre pour analyse pondérale, finement plissé.

3) 2 cc du filtrat sont mesurés et placés dans un tube à essai contenant 1 gr. d'acétate de soude, et 8 cc d'eau distillée. On retourne le tube plusieurs fois jusqu'à dissolution de l'acétate, compte V gouttes de solution de sublimé à 5 p. 100, retourne à nouveau le tube qu'on abandonne pendant 25 minutes. Une teinte rose se forme lentement, et fonce jusqu'au rouge s'il s'agit de médullaire.

20 minutes après la mise en train de la réaction dans le liquide extractif, on prépare le tube témoin qui comporte 2 cc de solution T (adrénaline au 1/10.000 dans l'acide sulfurique N/100), 8 cc d'eau distillée, 1 gr. d'acétate de soude et V gouttes de solution de sublimé. La coloration rouge apparaît presque aussitôt; le maximum d'intensité est rapidement atteint. Au bout de 3 à 5 minutes, on filtre le témoin et le tube en expérience, ou bien on centrifuge et compare les liquides limpides au colorimètre.

Si p est la prise d'essai, T et S les chiffres du colorimètre respectivement pour le témoin et le tube en expérience, t la quantité d'adrénaline contenue dans le tube témoin, la teneur enadrénaline par kilog de glande fraîche sera donnée par :

$$\text{Adrénaline 0/00} = \frac{t \times 20 \times 10000 \times T}{2 \times p \times S}$$

Lorsque la teneur enadrénaline est trop faible, comme c'est le cas de la corticale par exemple, on prend 5, 6 et même 10 cc de filtrat, mais alors on ajuste le témoin et le tube en expérience au point de vue de l'acidité.

En ce qui concerne les lots qui ont subi *l'action du vide*, on pratique l'extraction au sortir du Scheibler, c'est-à-dire 24 heures après que le dosage de l'adrénaline libre aura été effectué. La pulpe étant desséchée, la pulvérisation est facile; il est inutile d'ajouter du sulfate de soude. Le dosage colorimétrique a lieu comme il est indiqué ci-dessus, mais le tube en expérience et le tube témoin sont mis en train en

même temps, puisque pour l'un et pour l'autre l'intensité maxima est atteinte en moins de 5 minutes.

*

* *

Il était tout naturel de penser que, dans les capsules surrénales fraîches, une copule d'origine vraisemblablement protéique pouvait protéger l'adrénaline contre l'oxydation, ce qui serait une explication de la lenteur de la réaction colorée à atteindre sa plus forte intensité. Nous avons donc essayé des macérations dans divers liquides. On sait que l'adrénaline est pratiquement insoluble dans l'eau. Si donc, elle y entre en solution et en quantité considérable il y a lieu de saisir le facteur solubilisant. Toutes nos expériences à ce sujet nous ont donné des résultats peu probants, de sorte que nous ne pouvons en faire état ici; nous espérons d'ailleurs reprendre la question dans un avenir prochain.

C. RESULTATS. ADRENALINE LIBRE ET VIRTUELLE DANS LES CAPSULES SURRENALES DE MAMMIFERES. REPARTITION

A l'aide de cette technique relativement simple, nous avons pu multiplier les expériences et étudier la question à divers points de vue. Pour chaque animal, nous apportons des chiffres précisant la répartition de l'adrénaline à l'intérieur de la glande. Nous étudions aussi l'adrénaline sous deux formes, libre et dissimulée, dans les zones corticale et médullaire en tenant compte de la position de la surrénale, droite ou gauche, de l'individu, de l'espèce. A chacun de ces

points de vue, correspond un certain nombre de résultats. Presque toutes les expériences ont été effectuées en double, et tous les résultats obtenus sont donnés. Nous les présentons dans les tableaux en séries numérotées, qui permettent toutes comparaisons utiles.

Tous nos résultats sont exprimés en **mmgr. d'adrénaline par gramme de tissu frais**, ou si l'on veut en **grammes d'adrénaline par kilog de tissus frais**.

Pour la corticale, le terme « indosable », signifie moins de 0,10 gr. par kilog.

*Répartition de l'adrénaline libre et virtuelle
dans les capsules surrénales des Mammifères.
(dosage sur échantillons moyens)*

Mouton	Corticale			Médullaire		
	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation
I	ind.	ind.		2.84	3	+
	ind.	ind.		2.50	4.12	+
II	ind.	0.14	+	2.48	3.15	+
	ind.	0.13	+	2.40	3.23	+
III	0.19	0.18	—	2.33	4.02	+
	ind.	ind.		2.99	3.70	+
IV	0.19	ind.	—	3.29	3.65	+
	0.18	ind.		3.33	3.55	+
V				3.10	3.67	+
				3	4.02	+
VI	ind.	ind.		4.38	4.57	+
	ind.	ind.		4.44	5.45	+
VII				3.05	6.66	+
				3.57	6.57	+
VIII				5.28	6.53	+
				5.28	6.62	+
IX					5.66	+
				4.82	7.70	+
X					8.06	+
	0.14	0.15	+	4.78	5.77	+

*Répartition de l'adrénaline libre et virtuelle
dans les capsules surrénales de Mammifères.
(dosage sur échantillons moyens)*

Espèce animale	Corticale			Médullaire		
	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation
Chèvre						
XXI	0.21	0.21		7.6	11.4	+
	0.13	0.13		6	10.5	+
XXII	0.09	0.11	+	4.12	5.86	+
XXIII	0.26	0.13	—	6.07	8.8	—
	0.24	0.19	—	6.34	8.24	—
Bœuf						
XXVI	0.40	ind.	—	2.69	3.70	+
	0.35	ind.	—	2.91	4.25	—
XXVII	0.21	0.16	—	4.27	4.72	+
	0.17	ind.	—	4.98	5.02	+
XXVIII	0.93	0.25	—	5.92	5.30	—
	0.60	ind.	—	5.60	5.48	—
XXIX				6.50	8.88	—
				5.48	8.85	+
Veau						
XXX	0.66	0.56	—	5.45	7.72	+
	0.59	0.52	—	6.49	7.40	+
XXXI	0.50	0.23	—	5.95	9.90	+
XXXII	0.49	0.60	+	5.88	9.25	+
XXXIV				6.32	8.01	+
				5.74	6.66	+
XXXIII				5.88	9.43	+
Porc						
XXXIX	0.19	0.14	—	1.76	1.97	+
	0.16	0.15	—	1.93	2.35	+
XL	0.30	0.22	—	3.04	2.30	—
XLI				3.47	4.58	+
					4.63	+
					4.73	+
					5.	+
XLII	0.57	0.28	—	3.17	3.83	+
XLIII	0.38	0.30	—	4.34	5.26	+
XLIV	0.29	0.28	—	4.58	5.91	+
XLV	0.72	0.55	—	2.72	3.64	+

*Répartition de l'adrénaline libre et virtuelle
dans les capsules surrénales des Mammifères.
(dosage sur échantillons moyens)*

Espèce animale	Corticale			Médullaire		
	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation
Cheval						
LIV	0.23	0.25	+	3.70	3.80	+
	0.16	0.16		4.22	5.55	+
				3.92	4.87	+
LV	0.20	0.10	—	4.90	9	+
	0.12	ind.		4.87	7.03	+
LVI	0.40	ind.	—	5.19	7.27	+
	0.10	ind.		5.80	8.28	+

I. Adréline libre

1. RÉPARTITION DE L'ADRÉNALINE LIBRE AU MOMENT DE LA MORT DE L'ANIMAL.

Les tableaux précédents éclairent la question de la *répartition de l'adrénaline* dans la surrénale.

a) La zone médullaire seule possède une teneur importante en adrénaline, qui dépasse toujours 1 gr. et peut atteindre 7 à 8 gr. par kilog; **mais la corticale paraît en renfermer toujours des traces**, et parfois des **quantités appréciables**, qui n'arrivent jamais cependant à 1 gr.

La présence d'adrénaline corticale, révélée par la méthode chimique nous paraît indiscutable. Est-ce à dire que l'adrénaline puisse être un produit de sécré-

tion de la corticale ? Cela nous paraît absolument improbable, trop de raisons militent contre la théorie d'ABELOUS.

Tout d'abord, nous avons vu les défauts de la méthode à l'iode qui n'est pas spécifique de l'adrénaline. ABELOUS et ses collaborateurs, de même d'ailleurs que les auteurs qui ont utilisé la méthode de FOLIN (SUGAWARA [130], WATANABE [144]) ont cru trouver des quantités importantes d'adrénaline dans la corticale. En dehors de la non spécificité de leurs méthodes, leurs résultats élevés s'expliquent bien par le choix des surrénales employées.

Nous avons vu en effet que dans certaines glandes, la séparation des deux zones est très difficile. Chez le bœuf et le porc où l'enveloppe conjonctive pénètre souvent jusque dans la profondeur de la surrénale, la dissection rigoureuse est extrêmement délicate. Or, ABELOUS et ses collaborateurs effectuent leurs expériences sur la recherche de l'adrénaline corticale chez le bœuf, SUGAWARA [130] chez le bœuf, le porc, le lapin, le chien, le chat et WATANABE [144] utilise le lapin. Là, sans doute, se trouve une explication de leurs chiffres d'adrénaline corticale si élevés.

Il suffit d'ailleurs qu'au cours de la dissection un fragment infime de médullaire soit enlevé avec la corticale pour fausser entièrement les résultats.

Et ce qui confirme notre idée, c'est que parmi nos résultats d'adrénaline corticale, les plus élevés sont justement ceux des surrénales dont la dissection est la plus délicate. Tandis que chez le mouton et la chèvre, nous n'avons que rarement décelé plus de

0,25 d'adrénaline (en moyenne 0,12 chez le mouton, et 0,18 chez la chèvre), au contraire nous avons trouvé jusqu'à 0,87 chez le porc, 0,93 chez le bœuf et 0,74 chez le veau. Or, ce sont précisément les surrénales dont la dissection nous a paru la plus délicate à des points de vue d'ailleurs différents.

On a souvent fait l'hypothèse que l'adrénaline corticale provenait de la médullaire par diffusion simple par les vaisseaux. L'expérience de KOHN et FUCHS est à cet égard fort intéressante : La corticale séparée de la médullaire plusieurs heures après la mort de l'animal donne un extrait à propriétés hypertensives marquées, tandis que la corticale séparée dès la mort de l'animal n'a pas ces propriétés. SUGAWARA [130] note par la méthode de FOLIN, un enrichissement marqué de la corticale restée au contact de la médullaire, nous-même l'avons remarqué.

Naturellement cette diffusion est accélérée et augmentée lorsque la glande est manipulée. Deux surrénales du même animal (mouton) sont apportées au laboratoire. L'une est traitée avec un maximum de précautions, l'autre un peu roulée dans les doigts. Toutes les deux sont disséquées : la corticale de la surrénale manipulée contenait deux fois plus d'adrénaline (0,22) que la corticale de la surrénale traitée avec soin (0,11).

Enfin, nous verrons par la suite que la corticale ne contient que rarement de l'adrénaline dissimulée. La présence de la seule adrénaline libre dans la corticale peut être considérée comme un argument en fa-

veur de la diffusion de l'adrénaline libre de la médullaire.

Il nous paraît donc probable que l'adrénaline que l'on rencontre en faible quantité, mais de façon indiscutable dans la corticale provient soit d'une imperfection de la dissection, soit de la diffusion de l'adrénaline médullaire, soit, mais d'une façon accidentelle, d'ilots de médullaire, errants au sein de la corticale (CIACCIO, d'après TOURNADE [19]).

b) Si l'on compare, soit dans la corticale, soit dans la médullaire les résultats d'une même série de dosages, on les trouve généralement assez voisins. Parfois, on rencontre cependant, notamment dans la corticale, d'assez gros écarts d'un chiffre à l'autre. Il semble que l'on puisse expliquer ces cas, à vrai dire assez rares, par la présence fortuite d'une trace de tissu médullaire enlevé avec la corticale.

2. VARIATIONS DE LA TENEUR EN ADRÉNALINE DES DEUX ZONES SURRÉNALES, SELON LA SURRÉNALE, L'INDIVIDU, L'ESPÈCE.

Les tableaux suivants indiquent également les variations de l'adrénaline selon la surrénale, l'individu et l'espèce. Tous les résultats antérieurs aux nôtres se rapportaient à la glande entière; tandis que nous étudions ces variations dans les deux zones séparées.

a) **Dans la médullaire**, les chiffres sont différents suivant l'origine de la surrénale.

1) Il est classique de dire que les deux *surrénales* d'un même individu contiennent sensiblement la

même quantité d'adrénaline. BATTELLI [35] l'avait déjà noté. Diverses expériences ont été basées sur cette notion (ELLIOTT [57]) qui n'est en défaut que chez le cobaye (TOURNADE [19]) et nous signalons, entrè autres, celles de LANGERON, PAGET et LOHÉAC [81], sur l'influence de la cadavérisation (comparaison de la teneur en adrénaline d'une capsule dès après la mort, avec la teneur de l'autre capsule du même animal, laissée in situ 24 heures). Les chiffres que nous apportons sont trop peu nombreux pour tirer une conclusion ferme, dans deux cas sur trois on note des différences dans la teneur en adrénaline des deux surrénales du même animal.

Adrénaline libre et virtuelle
dans les capsules surrénales des Mammifères.
(Comparaison entre les teneurs des deux glandes
du même individu)

Espèce animale	Corticale			Médullaire		
	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation
Mouton XI						
S. droite XII				4.60	6.20	+
S. gauche				4.55	5.40	+
Veau XXXV						
S. droite XXXVI	0.54	0.40	—	4.81	7.14	+
S. gauche	0.74	0.35	—	6.89	7.04	+
Porc XLVI						
S. droite XLVII	0.60	0.10	—	2.85	4.76	+
S. gauche	0.55	0.46	—	3.50	2.90	—

2) Les différences constatées *d'individu à individu*, appartenant à la même espèce, peuvent être importantes. Ainsi, chez le mouton, l'adrénaline trouvée dans la médullaire varie de 2,56 à 7,60, chez la chèvre de 3 à 6,61. Il semble que la teneur soit plus stable chez le porc où elle gravite autour de 3 gr.

Adrénaline libre et virtuelle
dans les capsules surrénales des Mammifères.
(Variations d'individu à individu)

Espèce animale	Corticale			Médullaire		
	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation
Mouton						
XIII				7.60	8.20	+
XIV				5.80	6.80	+
XV				3.83	4	+
XVI				6.30	8.62	+
XVII	0.40	0.27	—	5.45	4.25	—
XVIII	0.26	0.28	+	6.45	7.83	+
XIX	0.38	0.10	—	4.81	8.33	+
XX	0.25	0.37	+	2.56	4.85	+
Chèvre						
XXIV	0.23	0.18	—	6.61	8.33	+
XXV	0.18	0.13	—	3.	3.70	+
Veau						
XXXVII	0.46	0.50	+	5.58	7.01	+
XXXVIII	0.70	0.80	+	6.41	9.40	+
Porc						
XLVIII	0.16	0.10	—	2.56	2.64	+
IL	0.40	0.25	—	3.30	2	—
L	0.30	0.22	—	2.85	1.95	—
LI	0.36	0.31	—	3.41	2.61	—
LII	0.66	0.64	—	3.44	3.10	—
LIII	0.87	0.64	—	3.22	4.87	+

Ces variations individuelles ne peuvent étonner. Les auteurs sont d'accord à ce sujet, nous avons vu que LEULIER et GOJON [85] avaient trouvé une teneur en adrénaline variant de 0,73 à 1,76 pour la glande entière de mouton, de 0,45 à 2,36 chez la chèvre.

3) C'est surtout avec l'espèce animale que l'adrénaline subit de notables variations. Il est même surprenant de trouver de telles différences chez des espèces voisines comme le mouton et la chèvre où les surrénales présentent des caractères morphologiques communs. Tandis que la moyenne d'adrénaline médullaire est de 3,54 chez le mouton, elle atteint 6,02 chez la chèvre.

Adrénaline libre et virtuelle
dans les capsules surrénales des Mammifères.
(Variations d'espèce à espèce)

Espèce animale	Corticale			Médullaire		
	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation	Adrénaline libre (dosage immédiat)	Adrénaline totale (dosage après vide)	Variation
Mouton	0.12	0.11	—	3.54	4.98	+
Chèvre	0.18	0.16	—	6.02	8.96	+
Bœuf	0.44	0.14	—	4.82	5.77	+
Veau	0.56	0.48	—	5.96	8.09	+
Porc	0.37	0.27	—	3.12	4.01	+
Cheval	0.20	0.12	—	4.65	6.54	+

La médullaire de bœuf est moins riche en adrénaline (4,82) que celle de veau (5,96); cette différence déjà notée par FENGER [61] s'accroît encore si l'on reporte les chiffres non plus à la médullaire, mais à

la glande entière; la corticale de veau a en effet des dimensions très réduites (1).

b) Quant à l'adrénaline de la zone corticale les chiffres que nous donnons peuvent ne correspondre qu'à des imperfections de technique. Comme nous l'avons précédemment indiqué, nous croyons que l'existence de l'adrénaline de nature exclusivement corticale n'est pas démontrée. Aussi les chiffres d'adrénaline corticale ne sont-ils donnés que sous réserve.

Sans doute d'individu à individu, observe-t-on quelques variations, mais c'est surtout d'espèce à espèce que les différences sont tranchées. Les moyennes, que nous avons déjà signalées en partie, le montrent clairement (tableau, p. 117). Ce sont justement les surrénales faciles à disséquer qui donnent les chiffres les plus bas, 0,20 au maximum (mouton, chèvre, cheval).

Au contraire, les surrénales difficiles à disséquer de façon rigoureuse présentent des teneurs élevées. Chez le bœuf et le porc (LEULIER ET REVOL [227]) la limite de séparation des deux zones est peu visible, chez le veau la capsule turgescente est gonflée de liquide qui, durant la dissection, diffuse et se répand sur la zone corticale.

(1) Pour comparer les résultats qui concernent la médullaire avec ceux des auteurs qui se rapportent à la glande entière, il faut utiliser des coefficients qui varient selon les espèces et l'âge des animaux. Chez le mouton adulte, le rapport en poids $\frac{M}{C}$, que TOUJAN avait fixé à $\frac{1}{3,7}$ nous paraît dépasser $\frac{1}{4}$. Chez le bœuf il est voisin de $\frac{1}{2}$ et chez le veau proche de l'unité.

II. Adrénaline virtuelle

La détermination de l'adrénaline virtuelle a été effectuée par différence entre deux dosages, c'est-à-dire entre le chiffre de l'adrénaline totale, après libération dans le vide sec de l'adrénaline masquée, et le chiffre d'adrénaline à la mort de l'animal (LEULIER et REVOL [87]).

C'est le vide que nous avons utilisé pour mettre l'adrénaline virtuelle en liberté, comme l'avaient fait avant nous MOURIQUAND, LEULIER et GOJON [70], LANGERON, PAGET et LOHÉAC [81].

Comparés aux résultats de ces auteurs, les nôtres sont beaucoup plus élevés : nous avons rencontré de plus grandes quantités d'adrénaline virtuelle, et ceci, parce que la technique de dosage que nous avons suivie diffère quelque peu de la leur. Nous avons en effet considéré les pulpes de surrénales desséchées dans le vide, comme des poudres de surrénales, ou des solutions pures d'adrénaline, c'est-à-dire des produits où l'adrénaline complètement libre est immédiatement décelée par ses réactifs et chez lesquels le maximum d'intensité est atteint au bout de 5 minutes; tandis que les auteurs précédents avaient cru que les pulpes desséchées dans le vide se comportaient comme les pulpes fraîches et avaient commis l'erreur d'attendre 25 à 30 minutes pour colorimétrer.

1. DANS CERTAINES CONDITIONS BIEN PRÉCISÉES
L'ADRÉNALINE VIRTUELLE A PU ÊTRE DÉMASQUÉE
DANS LA MÉDULLAIRE.

Toutes les fois que le délai entre la mort de l'animal et la mise au vide a été court, et le vide profond, nous avons constaté un mûrissement en ce qui concerne l'adrénaline de la *médullaire*. Si l'une ou l'autre de ces conditions n'était pas remplie, les deux chiffres « D. I. », c'est-à-dire adrénaline immédiate et « VIDE », c'est-à-dire adrénaline totale, étaient voisins et parfois le premier était le plus élevé.

Aussi les échecs sont-ils relativement nombreux en ce qui concerne les capsules de dissection longue, porc (6 échecs sur 19), bœuf (2 échecs sur 8). Les expériences XLVII, IL, L, LI, LII, sur les surrénales de porc ont été, pour une cause accidentelle, mises en train 4 à 5 h. après le prélèvement.

Au contraire chez le mouton, presque tous les cas sont positifs (1 échec sur 29). Tous sont positifs chez la chèvre, le cheval et le veau (chez cet animal, la dissection rigoureuse est pratiquement impossible, à cause d'une diffusion obligatoire du suc médullaire, par contre la dissection peut être menée très rapidement).

Le vide accidentellement imparfait conduit à des échecs : c'est le cas de l'expérience XXVIII (bœuf).

2. LA CORTICALE NE POSSÈDE QUE RAREMENT DES TRACES
D'ADRÉNALINE VIRTUELLE.

Les lots de *corticale* ont toujours été traités en

même temps et dans les mêmes conditions que les médullaires correspondantes : notre but étant de comparer les chiffres d'adrénaline libre et totale des deux zones, nous nous sommes toujours placé pour l'une et l'autre dans des conditions rigoureusement identiques.

Le comportement de la médullaire et de la corticale à l'action du vide est très différent.

Tandis que régulièrement l'adrénaline médullaire est en partie masquée, fréquemment l'adrénaline corticale se présente entièrement libre. Ainsi 10 fois sur 15 chez le mouton, 6 fois sur 7 chez la chèvre, 3 fois sur 8 chez le veau, 5 fois sur 6 chez le cheval, le séjour au vide de la corticale n'amène aucun mûrissement. Chez le bœuf et le porc il y a toujours une perte d'adrénaline de la corticale au cours du séjour dans le vide.

Sans doute peut-on objecter que le bœuf et le porc sont également les seuls animaux (le cas unique du mouton peut être considéré comme accidentel) où des échecs aient été observés en ce qui concerne le mûrissement de la médullaire.

On peut répondre qu'il n'existe pas de cas, après séjour dans le vide, où simultanément l'adrénaline médullaire diminue et l'adrénaline corticale augmente, tandis que l'inverse se présente fréquemment (exp. III, IV, XXIII, XXVI, XXVII, IXL, XLII, XLIII, XLIV, XLV, LV, LVI). D'ailleurs la lecture du tableau des moyennes est suggestive : d'une façon générale il y a toujours augmentation dans la médullaire, toujours diminution dans la corticale. En réalité, il ne

faut pas attribuer une valeur absolue aux moyennes, et le tableau suivant nous donne un compte rendu plus fidèle du pourcentage de mûrissement dans la corticale et la médullaire.

*Libération de l'Adrénaline virtuelle
après un séjour de 24 heures dans le vide sec.*

Espèces animales	Corticale			Médullaire		
	Nombre de cas étudiés			Nombre de cas étudiés		
	Positifs	Négatifs	Totaux	Positifs	Négatifs	Totaux
Mouton	5	5	15	29	1	30
Chèvre	1	4	7	7	0	7
Bœuf	0	6	6	6	2	8
Veau	3	5	8	11	0	11
Cheval	1	3	6	7	0	7
Porc	0	15	15	13	6	19
Rapporté à 100	17 %	66 %		90 %	10 %	

Les chiffres sont assez éloquentes et à la fois affirment la justesse de la conception de l'adrénaline virtuelle, et infirment l'hypothèse d'ABELOUS sur le rôle adrénalinogène de la cortico-surrénale; 9 fois sur 10, la médullaire mûrit dans le vide, alors que le mûrissement n'a pas lieu 2 fois sur 10 dans la corticale.

TROISIÈME PARTIE

LIPIDES DES SURRÉNALES

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION

Antérieurement au terme lipide, actuellement adopté dans la nomenclature chimique, d'autres vocables furent utilisés pour désigner toute une classe de substances à caractères chimiques vagues, mais dont la propriété essentielle est restée la solubilité dans les solvants organiques neutres.

C'est OVERTON [254] qui créa le mot « lipoïde » à l'occasion de sa théorie sur le mécanisme de la perméabilité des membranes cellulaires aux anesthésiques (1900-1901). Les lipoïdes d'OVERTON forment une classe à caractères plus biologiques que chimiques : à ce point de vue ils englobent une série de corps très hétérogènes, mais qui sont assez étroitement associés dans les tissus. La seule propriété qui leur est commune se rapporte à un phénomène physique : leur pouvoir dissolvant vis-à-vis des anesthésiques et des hypnotiques, propriété qu'ils partagent avec les huiles et dont on a tiré parti dans l'établissement du coefficient de partage.

La définition a été ensuite élargie. On a entendu sous le nom de lipoïdes les corps qui, comme les

graisses, se dissolvent dans les solvants neutres. Peu à peu, cette classe s'est encore agrandie et BLOOR [156] en 1920, considère comme lipoïdes « les acides gras de poids moléculaire élevé, leurs composés naturels et diverses substances voisines, insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques ». BLOOR, suivant la complexité de la molécule, les divise en lipoïdes simples, éthers d'un acide gras avec la glycérine (graisses), ou avec un autre alcool (cires), et en lipoïdes composés dans lesquels se rencontrent les lipoïdes phosphorés, les glycolipoïdes et des substances tout à fait différentes comme les stérols.

En 1923, à Cambridge, la commission pour la Réforme de la nomenclature en Chimie biologique, a désigné sous le nom de « *lipides* » l'un des trois grands groupes de la Chimie biologique, les deux autres étant les *glucides* et les *protides*. D'après les décisions prises, le terme « lipide » désigne « *le groupe de substances qui comprend les matières grasses et les éthers sels possédant des propriétés analogues. Le terme lipoïde est supprimé* ». BRIDEL qui commente ces faits [159] ajoute « Le terme lipide ne peut être substitué à celui de matières grasses ou de glycérides. En effet le groupe des lipides contient en dehors du sous-groupe très important des glycérides ou matières grasses proprement dites, d'autres sous-groupes où se rangent les cires, les étholides, les cholestérides, les lécithides, les phosphatides, etc... Les matières grasses ou glycérides sont bien des lipides, mais tous les lipides ne sont pas des matières grasses ».

A. HISTORIQUE

On voit que cet essai de définition très générale englobe une quantité de substances complexes et que le groupe ainsi défini est très hétérogène.

Aussi, ne pouvant faire l'historique complet des recherches qui s'y rapportent, nous bornerons notre exposé aux lipides non phosphorés, comme le cholestérol et ses dérivés, et aux lipides phosphorés.

I. Cholestérol et ses dérivés

Tous les organes et les glandes à sécrétion interne en particulier renferment ces lipides, mais c'est sans aucun doute la surrénale qui a été à ce point de vue un des organes les plus étudiés.

a) LES RECHERCHES D'ABORD PUREMENT HISTOLOGIQUES ET QUALITATIVES, LOCALISENT LES LIPIDES SURRÉNAUX.

Primitivement, le cholestérol et ses éthers étaient confondus par les histologistes, sous le nom global de graisses. MOERS (1864) [244], HENLE (1865), (d'après CIACCIO [167]), KOLLIKER (1867) [208], notent la présence de graisse dans la zone corticale. Peu à peu, à l'aide de réactifs colorants divers, on essaya de scinder ce bloc en fragments plus accessibles et partant mieux connus. L'emploi du microscope polarisant, donne pour les éthers du cholestérol des résultats précis (KAISERLING (1895), d'après TOURNADE [19]). Bientôt l'emploi simultané de méthodes de co-

loration et de la lumière polarisée (KAWAMURA [207]) permet d'ébaucher la répartition topographique des lipides non phosphorés en particulier des éthers cholestéroliques.

CIACCIO [167] résumant les connaissances acquises en 1912 distinguait avant tout deux groupes de substances :

1°) L'un formé de gouttelettes isotropes, qui sembleraient être les corps gras proprement dits;

2°) L'autre, d'une grande complexité et dont le principal caractère histo-chimique est basé sur une réaction préconisée par l'auteur, est formé de « gouttelettes et de grains » isotropes ou anisotropes. (Il s'agit là en réalité des corps qui nous intéressent, c'est-à-dire le cholestérol et les phosphatides).

Ces quelques lignes montrent combien à cette époque était grande l'imprécision : il ne s'agissait certes pas là « d'espèces chimiques » !

Cependant, il est un fait indéniable au sujet duquel tous les histologistes s'accordent : c'est celui de la répartition topographique du cholestérol et de ses éthers dans la surrénale. Seul le cortex en apparaît pourvu. Quelle que soit la méthode histologique employée, coloration, imprégnation osmique, méthode optique, la corticale seule révèle la présence de lipides cholestéroliques. Il ne semble pas qu'histologiquement on puisse envisager la présence de ces corps dans une médullaire normale. Sans doute KAISERLING, d'après CIACCIO [167] en aurait rencontré, mais il s'agirait de cas pathologiques; KAWAMURA aurait remarqué parfois la présence de lipides, non biréfrin-

gents dans les cellules médullaires, BABÈS [148] également, mais alors il s'agirait de lipides localisés dans des îlots de substance corticale; errant au sein de la médullaire.

b) L'ÉTUDE DES VARIATIONS

DU CHOLESTÉROL DES SURRÉNALES A LIEU
AU MOYEN DES MÉTHODES CHIMIQUES QUANTITATIVES.

Cette opinion ferme sur la topographie du cholestérol et de ses éthers a été d'emblée adoptée par les chimistes. D'ailleurs ceux-ci se sont occupés non plus de la recherche qualitative, mais de l'examen quantitatif et ils n'ont pas comme les histologistes le moyen de pénétrer la structure d'un tissu, d'y rechercher et d'y localiser les corps in situ. Aussi faisant confiance aux données des histologistes, ils ont rapporté plus spécialement à la corticale le cholestérol extrait de la glande entière.

Le cholestérol total de la glande entière a été dosé par de nombreux auteurs. Les chiffres rapportés à mille grammes de glande fraîche, sont *extrêmement variables d'une espèce à l'autre*.

Par exemple, tandis que GRIGAUT [191] trouve en moyenne 45 gr. chez l'homme, MAYER, MULON et SCHAEFFER [232] annoncent 28 gr. chez le cheval et 3,3 environ chez le mouton. Ils traduisent ce fait en qualifiant de capsules *grasses* les capsules du cheval, et de *maigres* les capsules du mouton. SORG et JAFFÉ [273] notent chez les Ruminants une teneur ne dépassant pas 5 gr. et MANCEAU [230] donne pour les capsules surrénales du cobaye normal un chiffre

moyen de 62 gr. alors que MOURIQUAND et LEULIER [245] arrivent à 80 gr. pour les mêmes glandes du même animal.

Mais ces chiffres qui sont des moyennes ne varient pas seulement d'espèce à espèce. Il y a parfois d'un individu à l'autre des différences considérables. L'âge, le sexe, les conditions physiologiques ou pathologiques sont autant de facteurs qui interviennent et modifient la teneur des surrénales en cholestérol.

Contrairement à l'opinion de CIACCIO [167] qui croyait que dans la vieillesse la surrénale se vidait de lipides, d'autres (MULON [252]) admettent que c'est à ce stade que la surrénale est la plus riche. C'est aujourd'hui un fait paraissant acquis (PORAK [261]). D'ailleurs, si dès la naissance la glande est pourvue de cholestérol (CHAUFFARD, G. LAROCHE et GRIGAUT [165]), le plein n'est fait qu'après quelque temps (LEULIER et DÉCHANET [224], cinquième semaine chez le jeune chat).

Le sexe de l'animal intervient à coup sûr. C'est ainsi que GRIGAUT [191] admet un chiffre normal moyen plus élevé chez la femme que chez l'homme. MOURIQUAND et LEULIER [245] signalent un phénomène analogue chez le cobaye mâle ou femelle.

En réalité ces différences légères ne sont en rien comparables avec les variations de grande amplitude que présentent le cholestérol et plus généralement les lipides surrénaux, sous l'influence des conditions de vie.

Parmi les *facteurs physiologiques*, il en est peu dont l'étude ait été spécialement faite. L'influence

des fonctions génitales est cependant bien établie. MULON [251] parlait déjà en 1906 d'un parallélisme entre le corps jaune et la cortico-surrénale.

L'association embryologique et les variations symétriques du cortex et des glandes sexuelles favorisent l'idée d'une association physiologique : la synergie cortico-génitale est aujourd'hui admise et repose sur un certain nombre de faits. Il suffit que les glandes sexuelles subissent un changement pour qu'apparaissent dans la cortico-surrénale d'importantes modifications. Au cours du cycle menstruel, au cours de la grossesse, la corticale augmente de volume (CASTALDI [162], VERDOZZI [282]) et le cholestérol de la glande s'accroît de façon notable (GRIGAUT [191]). Bien mieux, chez les animaux où l'activité sexuelle varie avec la saison, il y a régulièrement une augmentation de la teneur en cholestérol de la surrénale, correspondant à la période d'activité de la glande sexuelle (WOODHOUSE [291]).

Parmi les autres facteurs physiologiques étudiés, il faut citer le mouvement et la vie en altitude.

LAIGNEL-LAVASTINE [214] signale (en 1918) chez les malades atteints d'agitation motrice, la disparition des enclaves cholestériques de la cortico-surrénale, et MULON, d'après l'auteur précité, admet qu'une agitation motrice, intense et prolongée, détermine l'épuisement des surrénales en lipides.

RABBENO [263] en expérimentant sur le cobaye vivant à haute altitude a constaté d'abord une diminution réelle du cholestérol surrénalien, suivie après adaptation, d'un retour à la normale.

Les facteurs *maladie*, ou *intoxication* amènent eux aussi d'importants changements d'ordre quantitatif. CHAUFFARD, GUY LAROCHE et GRIGAUT [163, 164] trouvent dans les surrénales de l'homme malade, de 2 à 95 gr. de cholestérol total, par kilog de glande fraîche. Leurs dosages chimiques, qui correspondent aux recherches histo-chimiques d'ALBRECHT et WELTMANN [145] leur permettent, comme à ces derniers, d'établir un rapport entre la maladie et la teneur de la surrénale en cholestérol. Depuis, de nombreuses expériences ont été faites pour étudier le comportement de la glande dans diverses maladies. C'est la diphtérie qui a donné lieu au plus grand nombre de travaux. Les importantes modifications (CHALIER [47]) de la surrénale au cours de l'intoxication diphtérique, sont notamment d'ordre chimique. La toxine diphtérique est surrénalotrope, le cholestérol disparaît presque de la glande (MOURIQUAND et LEULIER [247]). Chez les individus vaccinés (CLEVERS et GOORMAGHTIGH [169]) la « zone à cholestérine » s'élargit et le contenu lipidique augmente en proportions appréciables.

La toxine botulique a une action semblable à la toxine diphtérique, mais la diminution du cholestérol est moins marquée (MOURIQUAND, LEULIER et SÉDALLIAN [106]); d'autres toxines, comme la toxine tétanique ne semblent pas apporter de modifications sensibles (MOURIQUAND, LEULIER et SÉDALLIAN [248]). Enfin, on peut rattacher à l'action expérimentale des toxines, celle des brûlures répétées qui diminuent

rapidement le contenu lipidique des glandes surrénales (CREMA [171], LATTES [218]).

Dans certaines carences, comme dans l'avitaminose C, seules les surrénales s'appauvrissent en cholestérol, alors que les autres organes : foie, rate, poumon, et le sang lui-même conservent leur valeur normale (MOURIQUAND et LEULIER [245], Madame RANDOIN et Mlle MICHAUX [265]).

On a également étudié dans le même sens l'action de divers toxiques chimiques. Le chloroforme et les anesthésiques généraux (MANCEAU [230]), le naphthalène (MICHAÏL et VANCEA [241]) font disparaître en partie le cholestérol des surrénales, comme d'ailleurs de certains organes. Au contraire l'intoxication arsénisée (hydrogène arsénié) et oxy-carbonée (gaz d'éclairage) montre que ces poisons gazeux sont sans influence sur la répartition du cholestérol dans les organes du cobaye (MOURIQUAND et LEULIER [246]).

Toutes ces variations sont celles du cholestérol *total*, c'est-à-dire de l'ensemble du **cholestérol libre** et du **cholestérol éthérifié**. Aussi, lorsqu'on pousse plus loin l'étude du cholestérol surrénalien, **en distinguant ces deux formes**, la question se complique, et les chiffres donnés par différents auteurs au sujet du même animal sont parfois très éloignés. C'est qu'en effet les proportions relatives de cholestérol libre et de cholestérol éthérifié subissent les mêmes influences, qui modifient la teneur en cholestérol total.

Influence de l'espèce : le rapport $\frac{\text{cholestérol éthérifié}}{\text{cholestérol total}}$ est d'après FEX [179] de 80 à 85 p. 100 chez l'homme,

et d'après WOODHOUSE [291] de 90 p. 100 dans la sur-rénale de cobaye. Chez l'agneau, LAPWOOD (d'après SORG et JAFFÉ [273]) ne trouve que de petites quantités d'éthers; chez le bœuf, SORG et JAFFÉ [273] n'arrivent pas à 20 p. 100, et les mêmes auteurs ont des difficultés pour mettre les éthers en évidence chez la vache. Par la méthode histo-chimique, KAWAMURA [207] avait obtenu des résultats en parfait accord avec les précédents, tandis que ROSENHEIM et TEBB [270], chez les mêmes animaux n'ont rencontré que des éthers, et pas trace de cholestérol libre.

Les variations *individuelles* du rapport
$$\frac{\text{cholestérol étherifié}}{\text{cholestérol total}}$$
 plus difficiles à observer, ne semblent pas avoir donné lieu à des recherches.

Rares sont les auteurs qui se demandent si les variations du cholestérol total sont dues à l'un des deux ou aux deux éléments qui le forment. Quelques auteurs émettent l'hypothèse que l'élément variable n'est pas le cholestérol libre, mais les éthers du cholestérol. Ainsi le pensaient en 1913 LANDAU [215], WACKER et HUECK [284] qui sans vérifier cette intéressante donnée, la généralisent à tous les protoplasmas cellulaires. FEX [179] en 1920 lui apporte un commencement de vérification. GARDNER et GAINSBOROUGH, en 1928 [184], au cours de leurs recherches sur le cholestérol du plasma, notent que les éthers peuvent varier dans l'inanition, ou la suralimentation, mais que le cholestérol libre reste pratiquement constant.

II. Lipides phosphorés

Les lipides phosphorés ont, eux aussi, fait l'objet de nombreux travaux. Confondus à l'origine avec les autres lipides sous la vague dénomination de « graisse », et malgré l'amélioration des méthodes histo-chimiques (utilisation du Lugol, (ROMIEU [269]) de l'iode ou de l'iodure ferreux, (PARAT [255]) il n'existe qu'une idée assez confuse sur leur localisation et même sur leur présence. La création de méthodes micro-chimiques, ayant pour but de mettre en évidence le phosphore inclus dans leur molécule, ne peut donner de résultats intéressants (POLICARD et LEULIER [260]).

α) RECHERCHES CHIMIQUES QUANTITATIVES.

Seule la chimie est capable d'aborder la délicate détection des phosphatides; d'ailleurs les premiers travaux concernant cette détection en général, ont été faits sur des organes autres que les surrénales.

On s'aperçut bien vite de la difficulté que présentait l'isolement de ces corps. Aussi, depuis longtemps, a-t-on seulement caractérisé et dosé l'élément constant de leur molécule, le phosphore. ALEXANDER note sa présence. BERNARD, BIGARD et LABBÉ (1903) [155] supposent une « sécrétion active de lécithines par les capsules surrénales » et établissent un rapport de la graisse phosphorée à la graisse totale. MAYER, MULON et SCHAEFFER dans leurs premières recherches (1912) [232] s'étaient demandé si, à la présence de

mitochondries ne correspondrait pas l'abondance de quelque élément. Ces auteurs, après avoir étudié les capsules surrénales du cheval et du mouton concluaient à la fixation des lipides phosphorés par les mitochondries. Mais dans toutes ces recherches, il ne s'agit que du phosphore qualifié de *total* : on ne distingue aucune des formes moléculaires où il est inclus.

Le *phosphore*, on le sait, est connu comme le métalloïde dominant du cerveau, mais il domine également la minéralisation d'autres organes et en particulier des surrénales. Ceux qui se sont occupés des produits opothérapiques, ont pu également comparer la teneur en phosphore total des différents organes. Les surrénales tiennent une place prépondérante et arrivent dans le classement immédiatement après les testicules et le cerveau (LEMATTE, BOINOT et KAHANE [221]).

En serrant de plus près la question du phosphore total des tissus, on l'a bientôt réparti en quelques combinaisons plus ou moins caractéristiques. Les travaux ultérieurs de MAYER et SCHAEFFER sur les phosphatides ne reposent plus sur la notion de phosphore total, mais sur celle de *phosphore lipidique*, qui correspond plus exactement au phosphore des composés solubles dans l'éther. D'ailleurs, MAYER et SCHAEFFER délaissent bientôt les surrénales dans lesquelles ils n'ont jamais, à notre connaissance du moins, dosé le phosphore lipidique.

Rares sont ceux qu'a intéressé ce « témoin » des phosphatides dans les glandes qui nous occupent. JAVILLIER, ALLAIRE et MME HINGLAIS [204] l'ont trouvé

en quantités très importantes dans la glande entière où il atteint près de la moitié du phosphore total. Sa teneur est, de plus, remarquablement constante. Cependant MANCEAU [230] donne des chiffres de « phosphore des lécithines » beaucoup plus élevés et relativement variables chez le cobaye.

A côté du phosphore lipidique, JAVILLIER et ALLAIRE [201] ont dosé le *phosphore nucléique*, dont la notion est une contribution nouvelle à l'étude analytique du bloc « phosphore total ».

Les chiffres de phosphore lipidique et de phosphore nucléique pris en eux-mêmes ou dans leur rapport au phosphore total sont présentés comme des indices caractéristiques de la glande surrénale. Ceci est, à priori, discutable pour cette glande qui est formée de deux organes si différents. CIACCIO [168] pensait déjà en 1915, que la constance des lipides phosphorés était douteuse dans la surrénale, qu'il croyait, à ce point de vue, différente des autres glandes.

b) RECHERCHES CHIMIQUES QUALITATIVES.

Si les travaux sur les phosphatides pris dans leur ensemble (ou plus exactement sur le phosphore lipidique) semblent avoir apporté quelques données nouvelles, on peut dire que ceux qui ont essayé d'isoler et d'identifier les phosphatides surrénaux, sont très rares; on est parvenu seulement à entrevoir la présence d'une céphaline et d'une lécithine (O. CONNOR [170], WAGNER [285]).

III. Surrénales et Lipides

A) LA CORTICO-SURRÉNALE EST ESSENTIELLEMENT UNE ZONE A LIPIDES.

1°) Lorsqu'on parle des lipides des surrénales, l'accord est manifeste. Histologistes et chimistes les localisent étroitement dans la **zone corticale**. Et comment pourrait-il en être autrement, puisque, d'une part, ainsi que nous le verrons plus loin, la méthode histo-chimique est impuissante dans la médullaire à détecter les lipides, et en particulier le cholestérol, et que, d'autre part, la méthode chimique opérant sur la glande totale, et se rapportant aux données de l'histo-chimie, situe d'emblée dans la corticale la presque totalité des lipides qu'elle dose. Aussi les chiffres de cholestérol des pages précédentes sont-ils dans l'esprit des auteurs à rapporter presque entièrement à la cortico-surrénale. Il suffit d'ailleurs de quelques citations pour montrer combien cette opinion est classique. BIEDL [2] après l'exposé d'une analyse de surrénale totale de porc ajoute tout naturellement « La moelle avait été comprise dans cette analyse, comme elle est pauvre en lipoïdes le cortex doit en contenir davantage ». GRIGAUT [191] écrit : « La substance corticale seule nous intéresse, car c'est là que se localisent les granulations graisseuses riches en cholestérine ». LAGUESSE [79] décrit la surrénale comme résultant de la symbiose de deux organes « l'un lipogène, l'autre chromaffine ». Les livres classiques, qu'il s'agisse d'ouvrages de physiolo-

gie, d'histologie ou de chimie biologique étudient la surrénale en la divisant en « zone à adrénaline : la médullaire, et zone à lipides : la corticale » (POLICARD [15]).

2°) Aujourd'hui cette **zone à lipides** prend dans l'esprit de nombreux auteurs, une **importance considérable** (Sw. VINCENT [283]). Depuis qu'on a démontré que l'adrénaline ne pouvait totaliser les fonctions de la glande surrénale, les chercheurs se sont tournés vers la corticale.

Dans le développement ontogénique c'est la corticale qui apparaît la première (SOULIÉ [18]). La plupart des glandes accessoires sont (d'après PORAK [261]) de nature corticale. Si l'on ajoute que les physiologistes ont apporté un gros argument à la question en démontrant la nécessité vitale de la corticale (l'extirpation du corps interrénal des Sélaciens provoque leur mort), et la non nécessité de la médullaire (BIEDL [2], WHEELER et VINCENT [287], HOUSSAY et LEWIS [194, 195]) on ne s'étonnera pas du nombre considérable de travaux récents qu'a fait naître l'étude du cortex.

On a fait des extraits du cortex, comme on avait fait des extraits de médullaire. On a même isolé des produits de nature hormonique, capables de maintenir en vie des animaux surrénalectomisés (« cortine » de HARTMANN [192], hormone de KÜHL [212]) ce que les extraits médullaires et l'adrénaline n'ont jamais permis de réaliser.

3°) Le but des chercheurs est apparemment de trouver et d'isoler une **hormone** à propriétés physio-

logiques marquées, capable de suppléer à la surrénale déficiente. Mais l'application clinique primant la recherche chimique, on n'a pas étudié de façon précise ces extraits évidemment complexes (ISCOVESCO [198, 199]). On ignore à peu près tout de leur composition, comme on ignore encore beaucoup de choses sur la nature de chacun des lipides de la surrénale.

Par exemple, au sujet de leur détection, en bloc, quelques auteurs ont signalé la discordance entre les résultats de l'histo-chimie et les résultats des dosages chimiques (SORG et JAFFÉ [273]).

Quelle est la cause de ce phénomène ? La méthode histo-chimique est-elle défectueuse, ou les lipides sont-ils partiellement masqués à leurs réactifs ? Existe-t-il pour le cholestérol des surrénales comme pour celui du sang une sorte de combinaison avec les matières albuminoïdes (« protéo-cholestéride » de GRIGAUT [190], recherches de MACHEBŒUF [229]) ou bien les lipides surrénaux perdent-ils, par intermiscibilité les propriétés que l'histo-chimie utilise ordinairement pour leur détection ? Il semble que cholestérol et phosphatides forment des complexes définis : leurs variations sont parallèles dans la surrénale et d'autres organes (MANCEAU [230]) et dans le sang (BAUMANN et HOLLY [152]).

B. CERTAINES ASSOCIATIONS ENTRE LES LIPIDES DÉFINISSENT LES TISSUS.

Ces associations entre les divers éléments des lipides ont fait l'objet d'importants travaux. Nous

avons vu comment MAYER et SCHAEFFER, poursuivant l'étude des mitochondries (FAURE-FRÉMIET, MAYER et SCHAEFFER [178]) avaient été amenés à examiner de plus près les lipides des tissus. Si l'on excepte deux notes sur la micro-chimie des surrénales, qui ne comportent que quelques dosages d'acides gras, de cholestérol et de phosphore total dans les glandes surrénales du cheval et du mouton [232] aucun des importants travaux de MAYER et SCHAEFFER n'a trait aux surrénales. Il nous importe cependant de résumer leurs recherches et celles de leurs collaborateurs. Toutes ont une réelle valeur scientifique, grâce à la méthode précise de travail que MAYER et SCHAEFFER avaient préalablement mise au point [234]. En étudiant les lipides du sang, ils s'étaient aperçus que leur teneur paraissait constante [233]. Le même phénomène existait-il pour d'autres tissus, telle fut la base de leurs recherches. La difficulté de séparation à l'état pur de chacun des éléments des lipides (le cholestérol excepté) limite leurs efforts au dosage de ce cholestérol, des acides gras non volatils et de l'ensemble des phosphatides au moyen du phosphore lipidique [235].

Bientôt ils se rendirent compte que les *acides gras* et le *cholestérol* oscillaient autour d'une valeur constante dans les glandes (*constante lipocytiq*ue), tandis qu'ils subissaient dans le muscle d'importantes variations. Chez les animaux d'une même espèce, la teneur en cholestérol varie d'un organe à l'autre et caractérise un organe donné (*indice lipocytiq*ue). Enfin le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{acides gras}}$ (*coefficient lipocytiq*ue) situe chi-

miquement un organe dans une espèce donnée [236].

L'évaluation du *phosphore lipidique* apporte un caractère encore plus général. Il est invariable pour un organe donné dans toute une série animale, tandis que le chiffre d'acides gras varie, pour un même organe d'une espèce à l'autre. Le phosphore lipidique définit presque, lorsqu'on le rapporte au poids humide, l'espèce cellulaire considérée [237]. Bien plus, il paraît indépendant des états physiologiques comme l'inanition et la suralimentation, et ne semble donc pas engagé dans une combinaison constituant une réserve énergétique.

Une importante question se pose à ce sujet. Les graisses de réserve entrent en jeu dans le dosage des lipides. Aussi les coefficients ne peuvent être qu'approchés chez l'individu normal, et même, pour certains tissus comme le muscle où la réserve grasse est particulièrement localisée, la teneur en acides gras et en cholestérol est assez variable.

TERROINE [276] a eu le mérite de distinguer entre l'élément *constant*, et l'élément de réserve, qui est très *variable*; l'élément constant essentiellement formé d'acides gras, de cholestérol, de phosphatides, se détermine chez l'animal inanitié. L'élément variable conditionne l'inanition : les matières de réserve sont principalement constituées par les graisses neutres. Appliqué à l'animal inanitié, le coefficient lipocytyque est singulièrement renforcé et devient alors une véritable constante (TERROINE et Mlle WEILL [279]).

Au lieu du coefficient $\frac{\text{cholestérol}}{\text{acides gras}}$ on peut ne tenir compte que des acides gras provenant des lécithines (TERROINE et BELIN [277] ont récemment prouvé le bien fondé de cette substitution) et s'en tenir à $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phosphatides}}$, ce qui revient à $\frac{\text{cholestérol}}{\text{phosphore lipidique}}$ coefficient dans lequel chacun des éléments représente *une véritable constante tissulaire*.

MAYER et SCHAEFFER ont également étudié les rapports entre la quantité de lipides et l'imbibition en eau des tissus [238]. De même que les tissus n'ont pas tous la même teneur en lipides, ils n'ont pas tous la même imbibition. Or, on constate que plus un tissu est riche en cholestérol, ou plus son coefficient lipocytyque est élevé, plus ce tissu est riche en eau. Et ceci permet, puisqu'un tissu donné présente toujours la même proportion d'eau d'établir que l'eau est une *constante cellulaire* [239].

Telles étaient les premières conclusions de MAYER, SCHAEFFER, TERROINE et leurs collaborateurs. Depuis, la question des indices cellulaires a été serrée de plus près, et des points obscurs ont reçu quelques éclaircissements.

Deux notions nouvelles, intéressantes à des points de vue différents, ont vu le jour: celle du phosphore nucléique et celle de l'indice de non saturation des acides gras. JAVILLIER et ALLAIRE [202] ont étudié la première et ont montré que le phosphore nucléique, constituant normal de certains protoplasmes, classe à lui seul un tissu par sa constance même. Quant à la

notion des indices d'iode des acides gras, due à TERROINE et à ses collaborateurs, elle donne une idée qualitative de l'élément constant qui peut être féconde en résultats. [277]

TERROINE avait d'abord cru que la totalité des acides gras d'un tissu normal faisait partie de l'élément constant [276], il n'en est rien (BELIN [154]). Une faible partie est brûlée avec les matières de réserve. Aussi le coefficient
$$\frac{\text{Acide gras de l'élément constant}}{\text{phosphore lipidique}}$$

devient un quotient absolument indépendant de l'alimentation ou de l'inanition du sujet. L'indice d'iode des acides gras de l'élément constant, quelle que soit l'espèce, a lui aussi une valeur constante pour un même tissu, et comme il est la preuve de différences très nettes dans la composition des phospholipides des tissus, il devient une nouvelle constante lipocyti-que (TERROINE, HATTERER et ROEHRIG [278]).

Ainsi peu à peu, par tâtonnements successifs, arrive-t-on à entrevoir la composition chimique de certains constituants du protoplasma. L'association des diverses substances lipidiques en proportions définies est évidente. Sans doute, avec les moyens d'investigation limités et encore défectueux dont ils disposent, les chercheurs trouvent-ils des variations dans les teneurs des tissus en différents lipides, mais elles sont assez étroitement limitées. Des techniques améliorées et des recherches renouvelées établiront certaines conditions qui régissent l'équilibre cellulaire.

C) SURRÉNALES ET MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL.

L'abondance du cholestérol libre, et surtout du cholestérol éthérifié dans les capsules surrénales a conduit tout naturellement les auteurs à penser que ces glandes intervenaient dans le métabolisme de ce corps. Si l'on songe que les surrénales des deux animaux les plus étudiés sont pour des raisons de clinique et de laboratoire celles de l'homme et du cobaye, toutes les deux bourrées de cholestérol, on comprendra plus aisément encore le bien fondé apparent des diverses théories qui se sont fait jour, quoique ces théories puissent s'opposer contradictoirement.

1) La cortico-surrénale est *cholestérologène* pour CHAUFFARD, GUY LAROCHE et GRIGAUT [166]; cette notion est généralement admise en France. Soutenue notamment par ROTHSCHILD en Allemagne [271], elle repose principalement sur deux faits : le parallélisme entre l'hyperactivité des surrénales et l'hypercholestérolémie; l'hyperactivité de la surrénale restante après unisurrénalectomie.

2) ASCHOFF [146] et ses élèves nient tout rôle actif à la cortico-surrénale dans le métabolisme du cholestérol. Elle joue seulement un rôle *cholestérolopexique* : la surrénale n'est qu'un « centre de magasinage » de sorte que le dépôt de cholestérol est secondaire à l'hypercholestérolémie.

3) CIACCIO enfin [168] rejetant à la fois les théories de CHAUFFARD (« sans aucune donnée sûre et directe ») et d'ASCHOFF (« pas de rapport entre le cholestérol du sang et celui des surrénales ») confère à

la corticale le pouvoir de fabriquer des lipides complexes aux dépens des graisses communes et même des éthers du cholestérol.

Il va sans dire que ces diverses hypothèses ont rencontré des détracteurs. Les deux premières seules semblent subsister, mais la théorie de CHAUFFARD est très combattue par divers expérimentateurs qui nient à la surrénale tout rôle actif dans le métabolisme du cholestérol (BAUMANN et HOLLY [152], RANGLES et KNUDSON [264], JULIO [206]).

B. CARACTERES ET PROPRIETES DES LIPIDES RECHERCHE ET DOSAGE

Nous allons, avant d'exposer nos recherches, décrire succinctement les propriétés physiques et chimiques des corps que nous nous proposons de déterminer. Cette étude sommaire montrera en particulier les propriétés sur lesquelles sont fondées les méthodes de dosage (1).

I. Cholestérol et ses dérivés

a) HISTORIQUE. — La cholestérine a été isolée des calculs biliaires par CONRADI en 1775, et sans doute avant lui en 1769 par POULLETIER DE LA SAGE, mais son étude physique n'a été faite que par DE FOURCROY et surtout par CHEVREUL qui la nomma.

(1) Nous avons beaucoup emprunté pour la rédaction de ce chapitre à la thèse de FRÉCHIN [183], excellente monographie du cholestérol.

Elle existe dans tous les tissus, mais c'est surtout sa présence dans le sang qui a longtemps attiré l'attention des chimistes.

En 1858, BERTHELOT démontre que le cholestérol possède une fonction alcool secondaire et prépare différents éthers (acétate, butyrate, stéarate et benzoate). Plus tard apparaissent les réactions colorées (SALKOWSKI, 1872). (LIEBERMANN, 1885) mais c'est surtout au début de ce siècle que le cholestérol devient l'objet de très nombreux travaux tant sur sa constitution chimique que sur sa répartition et son rôle dans l'organisme.

b) CONSTITUTION. — Le cholestérol pur répond à la formule globale $C^{27}H^{46}O$ d'après les analyses de REINITZER, G. BERTRAND, PREGL et LIEB. Ce que l'on sait sur sa *constitution* dont l'étude a occupé de nombreux chimistes se réduit à peu de chose :

1) L'atome d'oxygène du cholestérol fait partie d'un *oxhydrile alcoolique*, puisque ce corps est capable de donner des éthers (BERTHELOT 1859) et d'autre part peut se transformer en cétone par oxydation au moyen de l'oxyde de cuivre (DIELS et ABDERHALDEN) : il s'agit donc d'un alcool (d'où la désinence *ol*), et cet alcool est secondaire.

Le déficit d'hydrogène dans la formule conduit à l'hypothèse de doubles liaisons ou de chaînes fermées.

2) Or le cholestérol ne semble posséder qu'une *double liaison*, car il fixe par addition une seule molécule de brome (WISLICENUS et MOLDENHAUER). L'hydrogénation a permis à WILLSTATTER et MEYER de saturer cette double liaison et d'aboutir à un dihydro-

cholestérol $C^{27}H^{48}O$. D'autres auteurs admettent l'existence d'une seconde double liaison, mais celle-ci est loin d'être démontrée.

3) Bien plus grande est l'incertitude où l'on se trouve au sujet du *squelette carboné* de ce corps, car on n'est pas arrivé à faire cadrer de façon définitive une formule détaillée avec ses propriétés connues. Toutes les formules données sont provisoires et comportent une large part d'hypothèse. Aussi les schémas de WINDAUS, de WIELAND, de STEINLE et KAHLENBERG peuvent être considérés comme des édifices de fortune, sortes de synthèse des recherches particulières des auteurs et points de départ de nouveaux travaux.

L'étude des produits de décomposition du cholestérol devrait apporter quelque précision, mais les résultats sont contradictoires; ils ne correspondent pas le plus souvent à ce que l'on sait sur la parenté possible de ce corps avec les terpènes qui donnent comme lui des réactions colorées particulièrement brillantes. Seules ces réactions rapprochent le cholestérol des terpènes, tandis qu'il a dans l'organisme quelques rapports avec les acides biliaires, rapports que les chimistes ont rendus plus nets in vitro (WINDAUS, WIELAND et JACOBI).

On connaît quelques corps naturels très voisins du cholestérol : le coprostérol, que l'on rencontre dans les fèces est un dérivé de réduction; l'oxycholestérol qui se forme naturellement par oxydation du cholestérol à l'air, et pour lequel LIFSCHÜTZ qui l'a beaucoup étudié a donné une réaction de coloration qui

porte son nom, mais l'existence même de ce corps en tant qu'entité chimique ne paraît pas démontrée sans conteste.

c) PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

Le cholestérol se présente sous forme d'un corps blanc, inodore, insipide, onctueux au toucher. Il est totalement insoluble dans l'eau pure, acide ou alcaline, cependant on arrive à le mettre en solution colloïdale (PORGES et NEUBAUER).

Par contre, les solutions de sels alcalins d'acides gras le solubilisent quelque peu. Il se dissout davantage dans les solutions de sels biliaires, surtout lorsqu'elles sont additionnées de savon (E. GÉRARD [188]), fait intéressant qui peut intervenir dans la genèse des calculs biliaires.

Les vrais solvants du cholestérol sont les solvants organiques neutres. Une partie se dissout dans 4 d'éther, ou de benzène, ou de chloroforme. A chaud la solubilité est double. Le cholestérol est moins soluble dans l'alcool éthylique froid, l'acétone. A l'ébullition il se dissout dans 9 parties d'alcool de densité 0.84.

Le point de fusion varie avec les échantillons qui sont rarement purs. On admet 146°-147° lorsque le cholestérol est hydraté.

Le plan de la lumière polarisée est dévié à gauche. En solution étherée $[\alpha]_D = -31.16'$, en solution chloroformique : $[\alpha]_D = -36.61'$.

Les stérols animaux bruts présentent dans le spectre ultra-violet des bandes d'absorption qui varient

d'intensité selon la pureté du stérol. Mais les mêmes stérols soumis à des cristallisations fractionnées ne donnent plus ces bandes, tandis que les produits retirés des eaux-mères les présentent encore.

HUGOUNENQ et COUTURE [196] ont observé que certains stérols, après exposition à la lumière ou irradiation à la lampe ultra-violette sont capables d'impressionner la plaque photographique.

Le mode de cristallisation du cholestérol varie selon que ce corps est hydraté ou anhydre.

Hydraté, il cristallise en belles tables rhombiques, transparentes, larges et minces, rarement entières, le plus souvent entaillées sur les bords. C'est la forme classique du cholestérol, celle qu'il revêt lorsqu'on le fait cristalliser de ses solutions alcooliques ou acétoniques et que le solvant est évaporé.

Anhydre, il est cristallisé en aiguilles blanches et soyeuses, enchevêtrées. C'est ainsi qu'on l'obtient par évaporation de ses solutions, éthérées, chloroformiques ou acétiques. Ces deux modes de cristallisation ont été utilisés par DENIGÈS [175] pour la diagnose de ce corps.

Par éthérification, le cholestérol est capable de donner des cristaux liquides. Les cristaux liquides dont les premiers furent découverts par LEHMANN (cité par MAUGUIN [231]) sont appelés ainsi à cause de leur biréfringence spontanée à l'état fondu, biréfringence comparable à celle des corps cristallisés. VORLANDER (cité par MAUGUIN) étendit le nombre de corps donnant un tel phénomène, et GAUBERT [186] s'attacha particulièrement aux éthers de cholestérol.

Il obtint des cristaux liquides en combinant le cholestérol avec de nombreux acides (acide tartrique, malique, succinique, etc...).

Une des propriétés les plus curieuses du cholestérol et de ses dérivés, mais *non de ses éthers* est de provoquer l'absorption d'eau qui peut devenir considérable. C'est le cas naturel de la lanoline riche en cholestérol. Les travaux de FONTÈS [181] ont déterminé les rapports entre l'absorption d'eau et la teneur d'une axonge en cholestérol. Cette affinité spéciale du cholestérol « qui n'avait jusqu'ici été utilisée que par les dermatologistes au point de vue de la préparation des onguents, présente un intérêt biologique évident, en ce qui concerne la rétention d'eau par les tissus normaux en cas d'œdème » (LAMBLING [10]).

d) PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

Elles se rattachent aux caractères connus du cholestérol, c'est-à-dire à la *fonction alcool secondaire*, à la *double liaison*, à la *structure moléculaire*.

1) Le cholestérol est capable de donner avec les acides des *éthers*. Chauffé avec l'anhydride benzoïque il donne un éther benzoïque (BERTHELOT), très peu soluble dans l'alcool froid et utilisé au dosage par GÉRARD (1895) [187], puis par DORÉE et GARDNER (1912) [176].

Avec l'anhydride acétique, le cholestérol donne un éther acétique à point de fusion très fixe, ce qui permet de rechercher les falsifications du beurre par addition de graisses végétales (BRUNO). L'éther allo-

phanique (FABRE [177]) obtenu par l'action de l'acide cyanique sur le cholestérol en solution étherée (BÉHAL) peut être utilisé en vue de la caractérisation (FABRE), et même, dans certaines conditions, du dosage de cet alcool (TANGE et MACOLLUM [275]).

C'est encore à sa fonction alcoolique que le cholestérol doit son *affinité pour les saponines*. Cette affinité des alcools en général pour les saponines a été découverte par HOUDAS en 1891 (d'après PÉNAU [257]). RANSOMS en 1901 [266] démontra que la saponine perdait ses propriétés hémolytiques par sa liaison avec le cholestérol et WINDAUS, en 1910 [289] utilisa le premier cette propriété pour le dosage du cholestérol dans les milieux biologiques. WINDAUS choisit parmi les saponines la digitonine, saponine de formule connue, retirée de la digitale; et qu'on peut obtenir cristallisée. Elle donne, en solution alcoolique, par simple addition avec le cholestérol, molécule à molécule, un complexe cristallisé, insoluble et stable. Seul le cholestérol libre est précipité à l'exclusion de ses éthers; de même qu'in vivo seul le cholestérol libre est anti-hémolytique. Aussi, est-ce la base d'une méthode excellente de distinction du cholestérol libre et éthérifié.

Les autres saponines (solanine, cyclamine, dioscine, etc.) donnent également des complexes chimiques plus ou moins bien cristallisés, mais leur manque de stabilité en interdit l'emploi au dosage.

2) La *double liaison* communie au cholestérol la propriété de fixer le brome et plus généralement les halogènes en donnant un dérivé dihalogéné. Ce

dérivé, d'où le cholestérol peut être régénéré, est utilisé, comme terme de passage en vue de sa purification.

3) Enfin, les stérols possèdent de remarquables *réactions de coloration* qui sont le plus souvent partagées avec divers corps de la série terpénique. Il est inutile de décrire ici ces nombreuses réactions; nous nous arrêterons seulement à celles qui sont utilisées dans les recherches micro-chimiques ou le dosage.

La *réaction de SALKOWSKI*, la première en date (1872) consiste à additionner une solution chloroformique de cholestérol ou d'éther de cholestérol d'un volume égal d'acide sulfurique concentré.

La solution chloroformique se colore très rapidement en rouge sang et passe ensuite lentement au « rouge cerise pourpre ». L'acide sulfurique est fluorescent. Si on le décante et le verse goutte à goutte dans un verre contenant de l'acide acétique cristallisable, on obtient une solution violette ou rose, virant au bleu et toujours fluorescente. Cette réaction, modifiée par LIEBERMANN (1884) et BURCHARD (1885) est à la base des méthodes colorimétriques de dosage les plus usitées : la solution chloroformique de cholestérol additionnée d'anhydride acétique et, en refroidissant, de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré et pur, donne une coloration rose qui passe au violet, au bleu, au vert, qui est stable pendant quelque temps.

Cette réaction est d'une exquise sensibilité. DENIGÈS, (1903) en combinant la réaction de SALKOWSKI

et celle de LIEBERMANN-BURCHARD, arrive à caractériser 2/100 de mmgr. de cholestérol en solution dans un centimètre cube de chloroforme.

La *réaction de GOLODETZ* (1908) consiste à traiter des cristaux de cholestérol par un mélange d'acide sulfurique et de formol (dans la proportion de 5 acide sulfurique, pour 3 de solution commerciale de formol). Les cristaux prennent rapidement une coloration brune. L'auteur note que les éthers du cholestérol ne donnent pas cette réaction.

C'est aussi sur les cristaux de cholestérol qu'il faut obtenir la *réaction de HEINTZ* (1908), mais cette réaction s'applique également aux éthers pourvu qu'ils ne soient pas en solution. Les cristaux traités par l'acide sulfurique contenant des traces d'iode présentent une série de colorations du violet au rouge.

Ces deux dernières réactions ont été plus spécialement utilisées en micro-chimie.

De très nombreuses réactions de coloration sont encore données par le cholestérol, ses éthers et ses dérivés; mais elles ne trouvent pas place dans ce chapitre, où l'exposé est limité aux réactions dont il pourra être question par la suite.

E) DOSAGE DU CHOLESTÉROL DANS LES TISSUS ET LIQUIDES DE L'ORGANISME.

Dans l'organisme, le cholestérol existe le plus souvent inclus dans un complexe protidique qu'il faudra détruire pour une extraction totale. Aussi l'opération qui est à la base de tous les modes de dosages est une solubilisation du cholestérol dans un solvant appro-

prié. Tant vaudra l'**extraction**, tant vaudront les résultats.

Aussi, les auteurs recommandent-ils de *préparer l'extraction* : par exemple de dissocier le tissu par l'action d'une liqueur alcaline (AUTENRIETH et FUNK [147]) ou alcoolique alcaline (GRIGAUT [191]). Dans certains cas, l'action à froid de l'alcool sodé est suffisante pour dissocier le complexe protéino-cholestérolique et c'est ce qui se passe en particulier pour le sérum sanguin (GRIGAUT [191]).

L'alcool absolu à lui seul détruit les liaisons avec les protides, et solubilise le cholestérol et les phosphatides, avec le minimum d'inconvénients pour ces derniers; mais l'extraction par l'alcool absolu est plus longue, plus délicatée. Elle doit se faire à chaud, et dans des appareils spéciaux. En effet une macération à froid, même très prolongée donne des résultats inexacts. Il faut procéder à une extraction continue. Pour cela, de nombreux appareils ont été préconisés; d'abord l'appareil de ZULKOWSKI modifié par SOXHLET qui donne des résultats imparfaits. Au contraire KUMAGAWA et SUTO [213] ont imaginé un appareil qui porte leur nom et dans lequel la substance est placée au sein de la vapeur du dissolvant. Cette lixiviation à chaud donne d'excellents résultats pourvu que la durée d'extraction soit suffisante.

Pour un dosage approché, mais pratiquement satisfaisant (5 p. 100), l'emploi de l'alcool sodé, permet soit directement (cas du sérum sanguin), soit après ébullition de quelques heures (tissus) d'extraire le cholestérol.

Une fois solubilisé, l'extrait alcoolique est débarrassé de matières étrangères aux lipides, que l'on obtient à un degré de pureté suffisant pour la suite du dosage.

Le cholestérol peut ensuite être **dosé** soit *pondéralement*, soit *colorimétriquement*.

KUMAGAWA et SUTO, GRIGAUT dosent le cholestérol par pesée à l'état cristallisé pur. E. GÉRARD [187] puis DORÉE et GARDNER [176] utilisent la formation de l'éther benzoïque, qui est soluble dans l'alcool bouillant et qui est presque insoluble à froid, mais la méthode la plus intéressante est celle de WINDAUS [289] avec ses nombreuses modifications macrochimiques et microchimiques. Elle repose sur le fait suivant : la digitonine précipite totalement le cholestérol libre de ses solutions alcooliques et le complexe obtenu est pratiquement insoluble en macrochimie dans les solvants usuels. La méthode de WINDAUS utilisée tant à la détermination du cholestérol libre que du cholestérol éthérifié (après saponification) a été employée par de très nombreux auteurs, et cela, semble-t-il, avec le maximum de satisfaction.

Les méthodes colorimétriques qui sont nombreuses et moins sûres ne demandent pas, comme les précédentes « une habileté d'exécution, un matériel coûteux, et un grand laps de temps ». Elles suffisent aux dosages cliniques, et peuvent être pratiquées en série.

C'est à BURCHARD en 1889 que l'on doit d'avoir utilisé la réaction colorée de LIEBERMANN-BURCHARD à un dosage du cholestérol. GRIGAUT [191] en France, en 1912, mit au point une technique tout à fait inté-

ressante, et AUTENRIETH et FUNK [147] en Allemagne en 1913 donnèrent une autre technique.

La méthode de GRIGAUT, que nous avons utilisée dans une grande partie de nos recherches, libère le cholestérol par l'alcool sodé, et reprend par l'éther. La méthode d'AUTENRIETH et FUNK, qui est celle employée par tous les expérimentateurs anglo-saxons, dissocie par la lessive de soude les tissus et le complexe où le cholestérol est engagé : l'extraction proprement dite a lieu ensuite par l'éther ou le chloroforme. C'est une méthode plus longue et plus coûteuse par le volume des solvants employés, solvants que l'on peut d'ailleurs récupérer. Elle donne des résultats un peu plus élevés que celle de GRIGAUT.

C'est sur le résidu de l'évaporation des solvants, éther ou chloroforme, qu'est pratiquée la réaction colorée de LIEBERMANN-BURCHARD.

Comparées à la méthode pondérale de WINDAUS, les méthodes colorimétriques donnent généralement des résultats moins élevés. Cela provient de l'extraction incomplète, en particulier pour celle de GRIGAUT. Cependant, les résultats qu'elles donnent restent acceptables en raison de leur marge d'erreur relativement faible (5 p. 100).

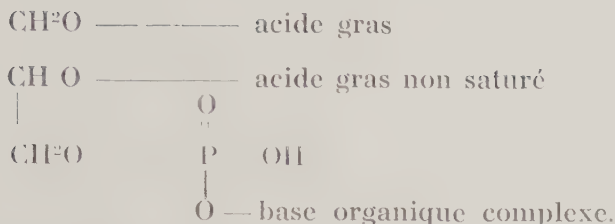
II. Les phosphatides

On désigne sous ce nom des lipides complexes azotés et phosphorés dont le plus important et le mieux connu appartient au groupe des lécithines.

A) ORIGINE, CONSTITUTION. — La lécithine a été dé-

couverte dans le jaune d'œuf, par le pharmacien chimiste GOBLEY en 1846, qui sut y mettre en évidence l'acide glycérophosphorique et des acides gras. C'est à DIAKONOW et STRECKER que l'on doit d'avoir identifié l'amino-alcool de la lécithine : la choline. Depuis la découverte de GOBLEY, on a retrouvé des corps analogues à la lécithine dans toutes les cellules animales ou végétales dès qu'on les a étudiées à ce point de vue. Elle existe dans les tissus, plus ou moins liée aux albumines et à la cholestérine. Il ne s'agit pas d'une combinaison, mais d'une adsorption, d'une affinité telle que l'éther n'enlève pas directement la lécithine dans le jaune d'œuf.

Il va sans dire que la lécithine n'est pas une, mais que les variétés sont nombreuses. Si l'on songe que dans cette molécule l'acide glycérophosphorique peut être l'acide α ou l'acide β , selon que l'acide phosphorique étherifie une des fonctions alcool primaire, ou la fonction alcool secondaire de la glycérine, et si d'autre part on pense aux divers acides gras saturés (palmitique, stéarique) ou non (oléique, linoléique, linolénique) capables d'éthérifier les autres fonctions alcool de la glycérine d'une façon totale ou partielle, et enfin que la base aminée n'est pas forcément la choline, on aura une idée de l'extrême variété des lécithines que l'on peut rencontrer. Toujours cependant, quelles que soient les modifications présentées, le squelette demeure schématiquement :



Aussi importe-t-il, lorsqu'on décrit une lécithine, d'en noter l'origine.

A côté de ce groupe de phosphatides essentiellement caractérisé par le rapport $\frac{\text{N}}{\text{P}} = \frac{1}{1}$ (lécithine du jaune d'œuf, céphaline), on en rencontre d'autres où le rapport devient $\frac{1}{2}$ (curine) $\frac{2}{1}$ et $\frac{2}{2}$ et dérivant tous de l'acide glycérophosphorique.

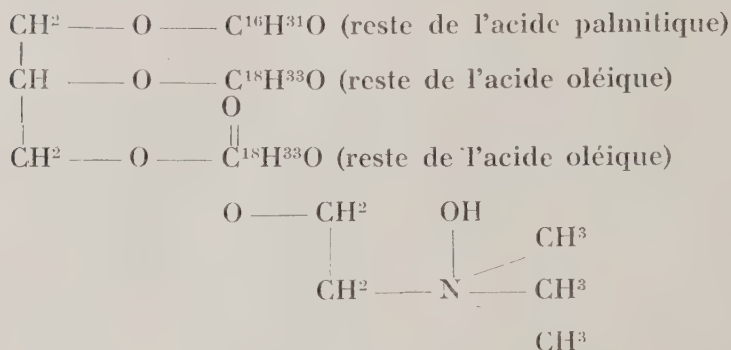
Chez d'autres enfin, l'alcool éthérifié n'est pas la glycérine (sphingomyéline).

B) CARACTÈRES. — Les auteurs décrivent (MAC LEAN [220] LEVENE [228] FOURNEAU [182]) un très grand nombre de phosphatides. En réalité comme le dit très bien FOURNEAU « quand il s'agit d'une substance aussi difficile à obtenir que la lécithine il faut distinguer entre ce qu'elle est et ce qu'elle pourrait être ». Seule la constitution de la lécithine du jaune d'œuf est à peu près connue à la lumière de recherches fort intéressantes sur la lysocytine (1).

La lécithine du jaune d'œuf est un oléo-palmito-

(1) Le venin de cobra tue par hémolyse. Or cette hémolyse ne se passe qu'en présence de lécithine, qui n'agit pas comme lécithine, mais comme dérivé d'hydrolyse partielle, la lysocytine. L'acide gras libéré est toujours non saturé, ce qui a permis d'expliquer la constitution de la lécithine.

glycéro-phosphate de choline. En réalité, la choline étant une base alcoolique ne donne pas un sel, mais un éther.



C'est, comme la définit FOURNEAU « Une graisse dans laquelle une molécule d'acide gras est remplacée par l'éther phosphorique de la choline ».

La lécithine du jaune d'œuf est extraite par l'alcool. L'évaporation laisse un résidu d'où l'acétone sépare un mélange de lécithine et de céphaline. La lécithine est précipitée par le chlorure de cadmium, on la purifie par recristallisation.

La lécithine du jaune d'œuf est une substance blanche, extrêmement altérable, très hygroscopique aussi se présente-t-elle habituellement sous forme d'une masse pâteuse colorée. Elle est soluble dans les solvants organiques en particulier dans l'éther anhydre, mais est insoluble dans l'acétone (caractère général des phosphatides). Dans l'eau elle gonfle en donnant une pseudo-solution stable qui a la propriété d'émulsionner fortement les graisses.

L'hydrolécithine, obtenue par LEVENE en réduisant la lécithine par l'hydrogène en présence de palladium

est cristalline, stable à l'air et très peu soluble dans les solvants organiques froids.

Les propriétés chimiques des lécithines sont fort intéressantes. Leur grande oxydabilité en fait un pourvoyeur d'oxygène de l'organisme, et leur richesse en phosphore leur a fait attribuer un rôle thérapeutique dont l'efficacité ne compense certes pas les pertes phosphorées normales.

c) DOSAGE. — Le dosage des phosphatides comporte de grosses difficultés.

1) Ces corps sont *instables*. Ils s'altèrent rapidement à l'air, surtout à la chaleur; ils changent d'aspect, deviennent insolubles dans leurs solvants habituels, en particulier dans l'éther. Lorsqu'ils sont inclus dans la cellule morte, leur altération est de deux ordres. Ils s'oxydent très rapidement lorsque le tissu se dessèche, puis sous l'influence de diastases spéciales qui modifient la molécule, le phosphore prend une forme minérale, qui devient, elle aussi, insoluble dans les solvants organiques. Cette instabilité de la molécule rend l'extraction très difficile. On ne peut songer à peser le résidu de l'extraction alcoolique qui renferme d'autres lipides, et si l'on ne se place pas dans des conditions très spéciales, vide et faible température, il est impossible de séparer les phosphatides des autres lipides. La difficulté devient presque insurmontable lorsqu'il s'agit d'isoler quantitativement chacun des phosphatides à l'état pur.

2) A défaut de caractères spécifiques, comme il en existe pour le cholestérol (réactions colorées, réactions de précipitations quantitatives) il est un élément

dont la présence constante caractérise les phosphatides : c'est le *phosphore*. Tous les phosphatides ont du phosphore dans leur molécule mais tout le phosphore tissulaire n'est pas lipidique. On peut schématiquement représenter le phosphore tissulaire total comme étant la somme $P \text{ total} = P \text{ lipidique} + P \text{ nucléique} + P \text{ minéral} + P \text{ organique inconnu}$.

Or, ainsi que l'ont montré MAYER et SCHAEFFER [237] TERROINE [277], pour le phosphore lipidique, JAVILLIER [203] pour le phosphore nucléique, le rapport de ces formes constitue un indice, une constante tissulaire caractéristique.

Evaluer le phosphore lipidique est une façon détournée mais logique d'exprimer la teneur d'un tissu en phosphatides. Il va sans dire que le chiffre de phosphore lipidique ne correspond pas exactement au chiffre de phosphatides puisqu'il peut y avoir par molécule un ou deux ou trois atomes de P, mais c'est une indication excellente et actuellement la seule à notre disposition. Quelques auteurs calculent leurs résultats en lécithine, cela entraîne une part d'arbitraire qui n'existe pas dans les cas précédents, puisqu'on ne préjuge point de la complexité des molécules où le phosphore est engagé.

3) Le dosage du phosphore lipidique comporte donc une **extraction** des lipides totaux, qui sont ensuite **purifiés** et **minéralisés** pour permettre le **dosage** du phosphore libéré de sa molécule complexe.

GÉRARD [189] desséchait le tissu avec du plâtre et portait à 100°. Il épuisait ensuite au Soxhlet par l'éther anhydre pendant 7 heures. GRIGAUT [191] et ISCOVESCO [197] nièrent la valeur de cette technique, in-

suffisante pour extraire tous les lipides phosphorés.

Les travaux de MAYER et SCHAEFFER apportent d'importantes modifications à cette technique, mais c'est à LEMELAND [222] qu'on doit une procédure rigoureuse et généralement adoptée.

LEMELAND réalise l'extraction, à effectuer sur le tissu dès après la mort, en utilisant comme appareil le Kumagawa et comme solvant, l'alcool. L'extraction dure 6 à 8 heures. La solution alcoolique est alors distillée dans le vide à basse température et le résidu est repris par l'éther anhydre qui ne dissout que les lipides.

Le résidu d'évaporation de l'éther est ensuite minéralisé et le phosphore dosé selon les méthodes ordinaires.

La technique de LEMELAND conduit au phosphore *éthéro-soluble* : bien que Mlle LE BRETON [158] ait démontré qu'une petite quantité, assez constante d'ailleurs, de ce phosphore n'était pas lipidique, et appartenait à des dérivés immédiats de l'acide glycéro-phosphorique, cela n'infirme pas la méthode qui reste très suffisante pour l'étude du métabolisme phosphoré.

Très récemment BLOOR [157] reprenait l'idée de BANG qui s'étonnait que l'on dose le phosphore pour apprécier une teneur en phosphatides : Le phosphore n'occupe qu'une faible place dans la grosse molécule des lécithines. Aussi BLOOR conseille-t-il de précipiter de leur solution alcoolique par le chlorure de magnésium et l'acétone, les deux plus courants des phosphatides, lécithine et céphaline, et d'en pratiquer le dosage par oxydation chromique.

CHAPITRE II

DÉTECTION ET LOCALISATION DU CHOLESTÉROL DANS LES CAPSULES SURRÉNALES

A. LES METHODES ANTERIEUREMENT UTILISEES

En histologie, plus encore que dans les autres domaines, les lipides furent d'abord étudiés sous le nom de « graisses », caractérisées par leurs solubilités et leurs réactions de coloration.

Cette imprécision est naturelle : pour distinguer les corps dont l'ensemble forme ce groupe disparate, il faut au chimiste de longues et délicates manipulations. Souvent même, à défaut de l'espèce chimique impossible à atteindre, on est obligé de se contenter du dosage d'un élément minéral dont la présence caractérise certains corps. Ensuite, grâce à des coefficients, on peut arriver à une évaluation approximative (cas du phosphore lipidique pour les phosphatides).

En histo-chimie le problème est presque insoluble.

1°) Les substances à identifier sont en très faible

proportion (de l'ordre du millième au millionième de mgr.) et les réactifs ne sont pas sensibles à l'infini.

2°) Les réactifs sont généralement d'une relative spécificité.

3°) Les réactifs et les réactions possibles sans dommage pour les coupes sont en nombre limité.

4°) Les substances à détecter ne sont généralement pas libres mais plus ou moins engagées dans une combinaison dont il faut les libérer, inaltérées, avant de les mettre en évidence.

On conçoit que la méthode histo-chimique pure soit rapidement limitée par la non spécificité, tandis que la méthode micro-chimique est limitée par le manque de sensibilité.

A ce propos, il convient de distinguer ces deux mots : histo-chimie et micro-chimie qui n'ont pas le même sens pour l'histologiste et le chimiste.

L'histologiste use volontiers du terme micro-chimie. Pour lui, c'est la mise en évidence sous le microscope, la localisation et l'évaluation très approximative d'un groupe de corps, grâce à certaines propriétés que présentent tous les corps du groupe (coloration, réaction colorée, imprégnation, etc.); alors que le chimiste entend par micro-chimie la caractérisation et le dosage de très petites quantités de substances, ce qui l'oblige aux réactions ultra-sensibles et aux évaluations les plus délicates (pesée au millième de milligramme par exemple et outillage très spécial).

La localisation des albumines dans un tissu, la détermination de l'acidité, de l'alcalinité cellulaires

par des matières colorantes jouant le rôle d'indicateurs, ne constituent pas des expériences micro-chimiques. Elles se rapportent plutôt à l'histo-chimie qui n'est souvent qu'une « ébauche d'analyse » (PRENANT [118]).

Les applications heureuses des méthodes chimiques en histologie se bornent à celles qui permettent l'identification d'un corps et sa localisation par des procédés assez sensibles et assez délicats pour ne pas altérer le tissu. Aussi, faut-il d'emblée rejeter les méthodes qui ne présentent pas ces caractères.

Une bonne méthode micro-histo-chimique doit être spécifique, sensible, d'une action douce, et ne peut être utilisée qu'à la détection de corps qui ne sont pas primitivement engagés dans une combinaison stable.

Il est certain que l'emploi du réactif molybdique (LILIENFELD et MONTI, MAC CALLUM, d'après PRENANT [118]), du molybdate d'ammoniaque et de l'acide sulfurique, (CASANOVA d'après PARAT [255]) pour détecter le phosphore des lécithines constitue un non sens (POLICARD et LEULIER [260]). Ce réactif brutal, non spécifique, ne peut mettre clairement en évidence le phosphore inclus dans la molécule des lécithines. C'est sans doute à des méthodes de ce genre que BRUNSVIK [160] fait allusion lorsqu'il rejette les tests micro-chimiques qui manquent de « subtile localisation », et qui sont partant « d'un infime secours en biologie ».

Au contraire l'emploi du xanthidrol à la détection micro-chimique de l'urée (POLICARD [259]) constitue

en principe une méthode micro-chimique type, car il s'agit là d'un réactif spécifique, sensible, dont l'action douce s'exerce, sans amener d'altérations, sur un corps libre, l'urée.

Mais il faut convenir que le nombre de réactions strictement micro-chimiques est limité et que rares sont les corps qui se prêtent à une telle détermination histo-chimique.

Cependant nombreuses sont les méthodes imaginées en vue de la localisation et de la diagnose des lipides. D'abord ce furent les méthodes colorantes, celles que LANGERON [216] appelle « méthodes d'analyse chromatique » basées sur la commune propriété des lipides de dissoudre électivement certaines matières colorantes. En concordance avec les résultats positifs donnés par ces méthodes, on découvrit que des cristaux apparaissent bi-réfringents en lumière polarisée, et la méthode optique qui devait se révéler féconde fut généralisée. Enfin, plus récemment, quand la composition des lipides eut été quelque peu éclaircie, on songea aux réactions colorées utilisées en chimie et qui sont données par des corps dont la mise en évidence constitue en général un test de la présence des lipides. En voici un aperçu sommaire :

1) DE NOMBREUSES TECHNIQUES D'ANALYSE CHROMATIQUE CARACTÉRISENT L'ENSEMBLE DES « GRAISSES ».

CIACCIO [167] dans une revue d'ensemble de la question, rappelle le nombre considérable de méthodes, il vaut mieux dire de *techniques* colorantes uti-

lisées : d'abord la simple coloration des corps par des solutions alcooliques, Soudan III (DADDI [173]), Scharlach ou aqueuses, bleu de Nil, qui sont électives, mais électives des « substances grasses ». Sans doute les auteurs ont-ils découvert que telle substance prend, au contact de tel colorant, une teinte particulière, alors que telle autre substance dans les mêmes conditions est colorée de façon différente; mais le plus souvent la différence est minime : il ne s'agit plus que de nuances, et ce qui est plus grave encore c'est que les auteurs ne s'accordent pas toujours quant à l'attribution de ces teintes.

A ces seules techniques simples de coloration des lipides succèdent celles plus complexes où l'on utilise les sels de chrome soit pour insolubiliser (méthode de FAURÉ-FRÉMIET et SCHAEFFER, méthode de CIACCIO) soit en vue de former ultérieurement une laque (méthode de WEIGERT).

Le pouvoir réducteur des acides gras non saturés est également utilisé à la diagnose des lipides. L'acide osmique est réduit, mais le dépôt noir (graisse indélébile) ou gris (graisse labile) qui s'est formé n'est pas dans la surrénale caractéristique des lipides. MULON [109] a en effet utilisé l'acide osmique à la détection de l'adrénaline médullaire. Et l'acide osmique est un corps qui se réduit avec une telle facilité !

GRIGAUT [191] indique de combiner sur des coupes en série plusieurs de ces colorations. Théoriquement des colorants comme le bleu de Nil, le Rouge neutre, le Soudan, un réactif d'imprégnation comme

l'acide osmique, surtout avec l'aide de la méthode physique, sur laquelle nous allons revenir, devraient permettre non seulement de localiser des lipides, mais encore d'en opérer la diagnose. En pratique il n'en est rien, et GRIGAUT conclut : « ces recherches manquent de précision, nul colorant des graisses n'est spécifique... ».

Ce manque d'électivité, cette part trop grande laissée à l'interprétation, conduisent à rechercher d'autres méthodes sans rejeter pour cela complètement les méthodes de coloration qui peuvent rendre, en histo-chimie, certains services.

2) LES RÉACTIONS COLORÉES DES CHOLESTÉROLIDES SONT ESSAYÉES EN HISTO-CHIMIE.

Peu à peu, la masse des lipides fut fragmentée, et les propriétés des groupes de corps ainsi créés furent étudiées.

L'un d'eux, celui des *cholestérolides* présente, nous l'avons vu, de magnifiques *réactions colorées*. Le cholestérol, constituant normal du protoplasma, peut être pris pour type des lipides. Sa présence une fois constatée permet de conclure, d'une manière à peu près certaine, à la présence de lipides en général, aussi la détection du cholestérol est-elle devenue un moyen élégant de s'assurer de la présence de lipides.

Les réactions colorées du cholestérol sont généralement données par le cholestérol libre et éthérifié. Ces réactions sont extrêmement nombreuses, mais nous plaçant strictement dans le cadre histo-chi-

mique, nous dirons quelques mots seulement sur celles qu'on a utilisées à la détection du cholestérol sur coupes.

HEINTZ (d'après ROMIEU [268]) se servait d'acide sulfurique seul, ou contenant des traces d'iode. STOCKER [274] localisa le cholestérol dans les cellules de Küpfer; il basait sa technique sur la réaction à l'acide sulfurique formolé de UNNA et GOLODETZ [281] qui d'après ces auteurs ne détecterait que le cholestérol libre.

C'est surtout la réaction de SALKOWSKI-LIEBERMANN qu'on a adaptée à la détection histo-chimique du cholestérol libre et éthérifié.

In vitro, une solution chloroformique de cholestérol donne avec l'anhydride acétique et l'acide sulfurique une coloration rose devenant rapidement violette, et passant au vert.

Si l'on opère sur quelques paillettes de cholestérol, que l'on traite par une goutte d'anhydride acétique et une trace d'acide sulfurique, les cristaux prennent rapidement une belle teinte violette qui diffuse dans le liquide et vire bientôt au rouge.

Deux auteurs ont, à peu près à la même époque, appliqué cette réaction en histo-chimie animale, SCHULTZ en Allemagne, et ROMIEU en France.

SCHULTZ [272] fixe les tissus au formol très dilué et coupe à congélation. Les coupes sont exposées quelque temps à la lumière solaire, montées et très soigneusement séchées avec du papier buvard, (l'auteur insiste sur ce point). On verse ensuite sur la coupe un mélange à parties égales d'acide sulfurique

et d'anhydride acétique, ou d'acide acétique glacial. On couvre aussitôt. La réaction est complète en quelques secondes. Les régions riches en cholestérol prennent une coloration bleu foncé qui ne dure que quelques heures.

Schultz a examiné les surrénales. Le cholestérol et ses éthers sont localisés dans les régions colorées par le Soudan; d'après l'auteur, cette technique respecterait les plus fines structures des tissus, localiserait parfaitement le cholestérol libre et éthérifié, mais ne donnerait pas de préparations durables.

ROMIEU [268] recommande une technique sensiblement analogue. Les pièces sont fixées au formol ou au Bouin sans acide acétique, et longuement durcies dans l'alcool à 95° (1). On coupe à congélation. La coupe déposée sur une lame est recouverte d'une goutte d'acide sulfurique concentré qu'on laisse agir selon le cas de 3 à 15 secondes. Si le cholestérol est abondant la coupe devient rapidement rose pâle ou gris rose. On arrête l'action de l'acide par deux ou trois gouttes d'anhydride acétique pur. On lave avec le même liquide pour chasser l'acide sulfurique. On recouvre la préparation d'une lamelle qu'on lute aussitôt à la paraffine. La coupe prend une teinte variant du rose foncé au violet d'iris.

Mais la teinte fonce rapidement. Après quelques heures, il ne reste sur la lame qu'un fragment de tissu dilacéré et carbonisé par l'acide sulfurique.

(1) Cependant le cholestérol et ses éthers sont loin d'être insolubles dans l'alcool à 95°, d'autre part l'action de l'alcool fort se traduit aussi par des phénomènes de refoulement des produits solubles vers le centre de la pièce (LEULIER et NOEL [225])

Toute méthode histo-chimique utilisant l'acide sulfurique concentré paraît à rejeter à priori. Ce réactif en effet est extraordinairement brutal et enlève toute possibilité de conserver la préparation pour l'examiner à loisir. Au bout d'un temps assez court, la fine organisation des cellules est détruite.

Par ailleurs, il ne faudrait pas croire que cette réaction très sensible et étroitement spécifique détecte le cholestérol dans la cellule même. Elle ne fait que localiser dans une région : il s'agit seulement d'une topographie assez peu précise.

Tout ce que l'on peut admettre, c'est l'utilisation possible de cette méthode modifiée, pour situer les stérols dans les tissus végétaux, par exemple dans les graines. Des expériences nous ont montré que le tissu végétal plus résistant supporte mieux l'action brutale de l'acide sulfurique, mais la coloration est également fugace (1).

Enfin, dernier inconvénient de la réaction de LIEBERMANN, elle ne distingue pas le cholestérol libre du cholestérol étherifié. Nous montrerons plus loin que cette distinction est parfois fort intéressante.

3) LA LUMIÈRE POLARISÉE DONNE DES RÉSULTATS SURS-
ET DURABLES, MAIS NE DÉTECTE QUE LES ÉTHERS
DU CHOLESTÉROL ET CERTAINS PHOSPHATIDES.

Aussi la méthode optique, par ses résultats précis et durables, a-t-elle, dès que connue, retenu l'attention des chercheurs.

(1) MIRANDE [243] au cours de ses observations sur les stérinoplastes du bulbe de lis a utilisé des réactions analogues en vue de la diagnose de substances chimiques contenues dans les organites élaborateurs.

Déjà en 1857, METTENHEIMER (d'après CIACCIO [167]) signalait la présence de gouttelettes biréfringentes dans les foyers athéromateux de l'aorte. En 1866, DARESTE (d'après MULON [250]) découvrait dans les capsules surrénales de la tortue des corps présentant la croix de polarisation et qu'il crut être de l'amidon. DASTRE [174] démontra qu'il s'agissait de lécithine. C'est à KAISERLING en 1895 (d'après TOURNADE [19]) qu'on doit la diffusion de la méthode optique.

C'est d'ailleurs KAISERLING qui, un des premiers, rencontra dans la surrénale de Mammifères, des corps biréfringents, c'est-à-dire capables de rétablir la lumière lorsqu'ils sont placés entre deux nicols croisés. En effet, une coupe récente de surrénale de cobaye présente en certains points bien déterminés des gouttelettes ayant en lumière directe tous les aspects de globules de graisse, mais qui s'en distinguent en lumière polarisée. Tandis que la graisse neutre est isotrope, ces sphéroïdes sont lumineux et présentent le phénomène de la croix de polarisation.

Mais de ces « cristaux liquides », certains cristallisent sous l'action du formol, ou du froid intense (gaz carbonique) et gardent en lumière polarisée une magnifique biréfringence.

Chauffés à 50/60°, ils perdent leur anisotropie, qu'ils retrouvent en revenant à la température ordinaire, tandis que d'autres gouttelettes qui ont résisté à l'action du formol et du froid, continuent à 60° à présenter le phénomène de la croix.

Les opinions ont été longtemps très partagées sur l'identité de ces substances. BABÈS [148] se contentait

de remarquer que la présence des « cristalloïdes » coïncidait avec les régions riches en graisse. Les recherches de MULON [250], d'ASCHOFF [146], de KAWAMURA [207], de WELTMANN [286] semblent bien démontrer que ces gouttelettes biréfringentes qui se dissolvent avec facilité dans les solvants neutres, sont constituées au moins par deux groupes de substances : des éthers du cholestérol, qui cristallisent par le froid ou sous l'action du formol et perdent à chaud leur anisotropie, et des phosphatides qui conservent leur anisotropie, sauf à très haute température. WINDAUS [289] confirme ces données : ses expériences sur les reins pathologiques lui ont permis de constater que les produits biréfringents étaient d'autant plus abondants que le tissu était plus riche en cholestérol éthérifié.

Sans doute pourrait-on, en vue de distinguer dans cette biréfringence la part qui revient aux phosphatides, utiliser leur insolubilité dans l'acétone où les éthers du cholestérol sont très solubles. Cette méthode de dissolution fractionnée offre en histo-chimie fort peu de sécurité. Il faut donc se contenter de la distinction grossière par la chaleur, (GROSS, d'après V. PATZELT [256]), ou d'admettre que les produits biréfringents groupent éthers du cholestérol et phosphatides.

*

* *

L'histologie par des procédés divers a étudié la détection et la localisation de l'ensemble et de chacun des lipides dans la capsule surrénale. La méthode

chromatique détecte et situe l'ensemble, sans apporter d'idée spécifiquement qualitative. Sans doute l'acide osmique est-il capable de distinguer entre les graisses « labiles », solubles dans le xylol, et les graisses « indélébiles » insolubles dans le même réactif. Ce n'est là qu'un point de départ pour des recherches ultérieures (BERNARD et BIGART, MULON). Les méthodes des réactions colorées donnent une idée qualitative (cholestérol total) et une vague localisation; tandis que le microscope polarisant a l'avantage de localiser étroitement un des éléments importants des lipides, les éthers du cholestérol. Malgré cet avantage, cette méthode est loin d'être parfaite. Limitée dans ses applications (seul le cholestérol éthérifié, figuré, est détecté) elle peut prêter à confusion avec les phosphatides. Mais surtout elle ne détecte pas tout le cholestérol éthérifié (THAYSEN [280]).

Nombreux sont les auteurs qui pensent que seule la chimie est capable de révéler tout le cholestérol des tissus (POLICARD [258], FEX [179], SORG et JAFFÉ [273]).

Cependant, à peu près tout ce que l'on sait de précis sur la répartition des « lipides » des surrénales, a été appris par la méthode physique. — La répartition des lipides biréfringents groupés dans la corticale est à la base de théories sur le rôle du cortex surrénal dans le métabolisme du cholestérol (BAUMANN et HOLLY [152]). C'est à elle qu'est due la notion de l'étroite localisation des éthers du cholestérol notamment dans la couche spongieuse (spongiocytes), le reste de la fasciculée et la zone externe de la réticulée. — De plus pour BAGINSKI [150] le nombre des particules biré-

fringentes ne présente que des changements insignifiants d'un animal à l'autre, mais en réalité il y a des variations notables avec l'espèce et ceci explique souvent les divergences et les idées en apparence opposées de certains auteurs. Ainsi KAWAMURA [207], SORG et JAFFÉ [273] ne trouvent pas de cholestérol éthérifié chez les Ruminants, sauf chez le veau; tandis que MULON [250] et tous les histologistes signalent l'extraordinaire abondance des éthers chez le cobaye. Comme le cholestérol total, les particules biréfringentes varient aussi selon l'âge, le moment, les conditions de vie. Quelles que soient les méthodes d'analyse employées, les histologistes s'accordent pour démontrer l'abondance des lipides dans la corticale seule (MULON [250]), la médullaire présentant une composition très différente.

B. MÉTHODE AUX SAPONINES

I. Certaines saponines, en particulier la digitonine, donnent avec le cholestérol libre des combinaisons cristallisées susceptibles d'être utilisées en histochimie.

En chimie on ne possède pour détecter et pour doser le cholestérol libre qu'une méthode sûre, celle de WINDAUS [289] à la digitonine. Nous savons depuis HOUDAS, RANSOM et d'autres quelle affinité possèdent les saponines pour les corps à fonction alcool ou phénol. Les saponines, la saponine du Quillaya, la saponine du Sapindus, la gaïac-saponine, la dioscine (YAGI

[292]), la cyclamine, la digitonine ont toutes un pouvoir hémolytique plus ou moins accusé (KOFLER [210]) que la présence de certains corps à oxhydrile libre neutralise biologiquement (HAUSMANN, ABDERHALDEN et LE COUNT, d'après KOFLER [210]). C'est ainsi qu'avec le cholestérol, la réaction qui se passe par addition de une (digitonine, cyclamine) ou plusieurs (dioscéine) molécules de saponine, a une stabilité variable et se prête plus ou moins à l'isolement d'un complexe pur et cristallisé dépourvu de propriétés agressives vis-à-vis des hématies.

Parmi les saponines, WINDAUS [288] choisit la digitonine parce que cette saponine, qu'on peut exceptionnellement obtenir cristallisée, est capable de détecter le cholestérol dans un mélange comme l'insaponifiable des graisses, et de l'isoler en un complexe stable et de composition connue.

WINDAUS, dont les premières expériences portaient sur le cholestérol des reins pathologiques [289], put distinguer quantitativement les proportions relatives de cholestérol libre et éthérifié.

L'action de la digitonine est restée très générale. Elle s'applique à un grand nombre d'alcools et de phénols (WINDAUS et WEINHOLD [290]) et tous les stérols sont justiciables du procédé. Aussi KLEIN et PIRSCHLE [209] après avoir isolé les phytostérols du latex d'Euphorbes, tentèrent-ils de les détecter directement dans le latex lui-même. Ils appliquaient ainsi les premiers cette propriété à l'histo-chimie.

LEULIER et NOEL [225] y virent une élégante méthode à utiliser en histo-chimie animale. Leurs expé-

riences sur les surrénales de cobaye furent couronnées de succès.

Réaliser in situ la précipitation de cristaux stables semble l'idéal de l'histo-chimie, mais à condition d'identifier à coup sûr ces cristaux sous le microscope, et cela avec aisance. Dans cette vue, LEULIER et NOEL utilisèrent les premiers la biréfringence que présente le complexe cholestérol-digitonine cristallisé. Il va sans dire que dans un tissu optiquement vide, c'est-à-dire ne possédant pas avant l'expérience de cristaux ou de particules biréfringentes, l'examen est facile et le risque d'erreur limité. Ce n'est pas le cas de la surrénale du cobaye, où les éthers du cholestérol abondent, remarquables par leur biréfringence bien plus intense que celle du complexe cholestérol-digitonine.

Aussi la question s'est-elle posée d'améliorer la méthode de LEULIER et NOEL et de la rendre applicable à tous les tissus animaux. Sans doute aurions-nous pu choisir comme terrain d'étude des surrénales pauvres en cholestérol éthérifié. Cela aurait singulièrement simplifié nos recherches sur la signification des cristaux obtenus. Nous avons préféré choisir le cas le plus délicat, celui où les éthers abondent, tandis que le cholestérol libre n'existe qu'en proportion relativement faible : la surrénale du cobaye.

II. Étude de l'action des saponines sur le cholestérol in vitro.

Avant d'appliquer à notre tour la réaction de

WINDAUS, à la recherche histo-chimique, nous avons jugé indispensable d'étudier la réaction *in vitro*.

Notre étude a porté sur l'action de trois saponines : digitonine (1), saponine du *Quillaya*, et gaïac-saponine.

La *digitonine* employée présentait la plupart des caractères décrits par REICHARD [267] et MELANOFF [240] : solubilité dans l'acide sulfurique qui donne une solution limpide à froid. Elle cristallisait par évaporation lente de ses solutions alcooliques. L'éther la précipite entièrement de ses solutions dans l'alcool dilué, où elle est très soluble (LAUDAT [219]).

La *saponine du Quillaya* était amorphe, soluble dans l'alcool faible, en donnant une solution légèrement jaune, et insoluble dans l'éther.

La *gaïac-saponine* amorphe possédait comme les deux saponines précédentes un pouvoir hémolysant intense.

Nous avons successivement étudié les caractères de formation des complexes que donne le cholestérol avec ces trois saponines, et les propriétés micro-chimiques de ces complexes.

A. AVEC LA DIGITONINE.

C'est sur le complexe cholestérol-digitonine qu'ont porté surtout nos recherches.

a) Conditions expérimentales de formation du complexe.

Nous avons étudié *in vitro* les conditions d'obten-

(1) Nous avons utilisé de la digitonine Merck, et de la digitonine, saponine du *Quillaya* et gaïac-saponine que la Maison Roche avait gracieusement mises à notre disposition.

tion du complexe à l'état *cristallisé*. Elles sont réglées par la concentration et le degré alcoolique, la température, le temps laissé à la précipitation.

La solution de digitonine, à cause du peu de solubilité du cholestérol dans l'alcool faible, doit être effectuée dans l'alcool de titre assez élevé, 50°, et même s'il s'agit de solutions relativement concentrées, 1 p. 100 par exemple, dans l'alcool à 90°, sinon on s'expose à précipiter le cholestérol lui-même, ce qui peut être une cause de difficultés dans l'étude du complexe pur. Il faut employer un excès de digitonine, environ 4 fois plus de digitonine que de cholestérol supposé.

Les solutions alcooliques de cholestérol étaient à deux concentrations, l'une à 0,40 p. 100 dans l'alcool à 90°, l'autre à 1 p. 2000 dans l'alcool faible.

Pour obtenir un complexe bien cristallisé avec les solutions concentrées il faut précipiter à l'ébullition; l'addition de quelques gouttes d'eau, de façon à ramener le titre de l'alcool à 85° environ, accélère la précipitation et favorise la cristallisation.

Si l'on part de solutions très diluées, et dans l'alcool faible (ce qui est important, sinon la précipitation aurait difficilement lieu), il semble que ce soit la précipitation à froid, pendant des semaines, qui donne les meilleurs résultats.

Les cristaux qui se sont formés lentement sont plus gros et leur biréfringence est plus marquée.

b) Caractères de la réaction.

Cette réaction est intéressante par sa spécificité et sa sensibilité relative, mais largement suffisante.

Spécifique, elle l'est dans les conditions que nous rencontrerons en histo-chimie. Il existe peu d'alcools ou de phénols libres dans la vie animale où les processus d'oxydation ou de réduction sont rapides. D'ailleurs, si cette réaction n'était pas spécifique, les dosages chimiques qui l'utilisent seraient entachés d'erreur, et ce serait étonnant, puisque de très nombreux auteurs l'ont étudiée, modifiée, adaptée et que tous s'accordent sur sa valeur.

La réaction est sensible, WINDAUS la dit capable de détecter 0,02 de cholestérol dans 100 cc. de liquide, sensibilité suffisante en histo-chimie.

La réaction est constante. Le cholestérol adsorbé par le charbon en est arraché par la digitonine (EISLER, d'après KOFLER [210]), de même, le cholestérol est détecté facilement au sein d'un mélange de substances grasses, de pigments (HESS, THAYSEN [193]). C'est le cas en histo-chimie où d'emblée il faut pratiquer la réaction de diagnose sans essai d'isolement préalable.

c) Caractères du complexe.

Le complexe cholestérol-digitonine cristallise en fines aiguilles le plus souvent groupées en rosettes qui paraissent, dans le cadre limité qui nous occupe, tout à fait caractéristiques. Partant d'une solution pure de cholestérol, et d'une solution également pure de digitonine, aucune confusion n'est possible. Si les deux solutions ont le même titre alcoolique, le cholestérol ne peut précipiter, non plus que la digitonine : le produit cristallisé qui se forme ne peut être que le complexe.

En histo-chimie, le cas est beaucoup plus délicat. Le caractère de probabilité est insuffisant : il convient d'utiliser les caractères du complexe pour le distinguer de façon sûre.

Les rosettes présentent une *biréfringence* nette, quoique difficile à percevoir au premier abord, et qui semble s'atténuer un peu par dessiccation. Elle permet de repérer les cristaux en lumière polarisée, et de les retrouver en lumière directe. Néanmoins, la clarté qui limite les cristaux n'a qu'une valeur relative. Elle est de l'ordre du tiers de celle des éthers du cholestérol; aussi faudra-t-il en histo-chimie réunir tous les moyens capables d'améliorer la vision : bon éclairage du microscope, écran protégeant l'observateur, objectif de faible grossissement.

Les cristaux et leur mode de groupement sont *stables*. L'action de la chaleur faible, des colorants, des réactifs dissolvants les laissent inaltérés.

A la température de 50/60°, les cristaux demeurent biréfringents, et ceci permet de les distinguer dans une coupe des éthers du cholestérol, qui deviennent obscurs à cette température.

Les solvants n'ont pas, lorsqu'ils sont employés avec précaution, d'influence sur la présentation du complexe. Ainsi l'alcool à 70° qui dissout lentement les éthers du cholestérol, ne touche pas aux cristaux du complexe. Au contraire, on sait que l'alcool absolu les dissout quelque peu (0,014 p. 100, GARDNER et WILLIAMS [185]), de même que l'éther éthylique (0,0007 p. 100), et l'eau bouillante (0,006 p. 100) (H. MUELLER [249]). Dans une coupe, qui contient de très

faibles quantités de cholestérol libre, l'alcool absolu employé comme solvant des éthers du cholestérol aurait tôt fait de solubiliser le complexe.

L'alcool fort et l'éther ont surtout l'inconvénient de détruire la structure cristalline du complexe. C'est là un obstacle à son identification : une fois amorphe, toute biréfringence a naturellement disparu.

Enfin, la biréfringence du complexe est maintenue en présence de matières colorantes. Le Soudan III qui fait disparaître les propriétés optiques des éthers du cholestérol (LANGERON [216], TOURNADE [19]), n'altère nullement celles du complexe. Peut-être ce phénomène se ramène-t-il à l'action dissolvante de l'alcool à 70°, employé comme solvant du Soudan, qui dissoudrait les éthers et laisserait le complexe intact.

B. AVEC LES AUTRES SAPONINES.

Toutes les saponines ne précipitent pas le cholestérol de ses solutions (KOFER et RAUM [211]), et la digitonine mise à part, elles ne donnent que de façon très irrégulière un complexe cristallisé, ce qui fait rejeter leur emploi dans le dosage du cholestérol. La précipitation est incomplète, nulle en présence de solvants un peu énergiques du cholestérol. Le complexe est profondément instable. L'eau le dissocie en dissolvant la saponine, tandis que parallèlement les solvants organiques solubilisent le cholestérol.

Cependant dans certaines conditions (solutions dans l'alcool faible) la précipitation a lieu, incomplète. On la laisse se poursuivre à froid pendant plusieurs jours.

Lorsque, *in vitro*, il s'est formé un précipité cristallin, en partant de solutions pures (les saponines, dont la plupart sont amorphes, sont rarement pures), on peut avoir une quasi certitude de la présence du complexe, saponoside du cholestérol.

Malheureusement, dans le cas d'un tissu, il n'en est plus de même. Si le tissu d'abord optiquement vide contient après immersion dans la solution alcoolique de saponine des cristaux biréfringents, il est probable qu'il s'agit d'un complexe. Mais si le tissu, antérieurement à l'immersion présentait déjà des éléments cristallisés et brillants, il sera difficile de les distinguer des cristaux du complexe autrement que par la forme cristalline. Il ne peut être question d'utiliser aucun des moyens ordinaires, chaleur, solvants, colorants : le complexe disparaîtrait lui aussi.

C'est pourquoi nous attachons une valeur réelle à la méthode à la digitonine, et une valeur limitée à l'emploi des autres saponines.

III. Application de la réaction à la digitonine : détection, localisation du cholestérol dans la surrénale de cobaye.

Après avoir déterminé les conditions les plus favorables à la précipitation du complexe cholestérol-digitonine à l'état cristallisé, nous allons essayer l'utilisation de cette méthode à la détection du cholestérol libre dans la capsule surrénale du cobaye.

A) MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE.

D'abord faut-il fixer le tissu ? LEULIER et NOEL [225] immergent directement un fragment de tissu dans l'alcool à 35° et pensent qu'à cette dilution l'alcool est encore capable de fixer très correctement les pièces. Les éthers du cholestérol (nous l'avons vu plus haut) apparaissent à l'état cristallisé par simple action du formol. Il est préférable de les avoir d'emblée cristallisés, il faut donc fixer par le formol à 10 p. 100 dans le sérum physiologique.

La pièce, au sortir du formol, est laissée quelques heures dans l'eau physiologique, puis immergée dans une solution de digitonine à 1 p. 400 dans l'alcool à 50°. C'est la pièce qu'il faut immerger et non les coupes qui se désagrègeraient rapidement : la faible dimension de la pièce facilite la pénétration. — Il importe que la digitonine soit en solution dans *l'alcool faible*.

L'alcool est en effet préférable au réactif de CAMINADE formolé [161] (formol 18, alcool 9, acétone 73), recommandé par PARAT [255]. Des essais comparatifs nous ont montré que l'acétone dissolvait rapidement une partie des lipides de la corticale; le Soudan III ne donne alors qu'une faible coloration, et la digitonine ne précipite plus que de rares cristaux. Le même réactif de CAMINADE, où l'on a substitué de l'eau au formol, donne naturellement des résultats encore plus médiocres sur les pièces qui n'ont pas été préalablement fixées.

Enfin, l'alcool, solvant de la digitonine, doit être

de titre *faible*. LEULIER ET NOEL [225] ont montré que l'alcool fort, solvant des éthers du cholestérol, refoule ces éthers vers l'intérieur de la corticale. Nous nous sommes demandé si l'alcool faible, en pénétrant dans le tissu, n'apportait pas un trouble analogue. Deux fragments voisins ont été prélevés dans une surrénale, fixés, puis l'un a été immergé dans une solution de digitonine, l'autre d'abord coupé à congélation, et ses coupes soumises à l'action précipitante. Dans ces coupes, il ne peut plus être question de refoulement, la pénétration se faisant directement. Or, une coupe du premier fragment se montre superposable à une coupe du deuxième fragment au point de vue de la répartition du cholestérol et de ses éthers.

Le tissu ne peut évidemment qu'être coupé à congélation, l'inclusion à la paraffine enlevant intégralement les lipides; les coupes, minces, seront alors montées dans la glycérine gélatinée avec ou sans coloration.

Comment examiner la coupe ainsi préparée ? Par action de la saponine il a dû se former des cristaux de complexe, qu'il faut détecter et localiser de manière précise.

La lumière polarisée est le réactif le plus sensible que nous possédions. C'est elle qui détecte avec le plus de finesse le complexe cristallisé. Mais ce complexe a une double réfringence relative, très inférieure à celle des éthers du cholestérol (1) aussi fau-

(1) Nous nous sommes assuré que les éléments primitivement biréfringents étaient constitués uniquement par des lipides; leur entière solubilité dans l'éther ne laisse aucun doute à ce sujet.

dra-t-il bien distinguer.

Nous avons vu que la *chaleur* éteint la biréfringence des éthers du cholestérol, tandis que celle du complexe persiste. L'idéal est d'utiliser une platine chauffante à 70°, comme celle décrite par LEHMANN (d'après MAUGUIN [231]), le complexe demeure seul visible, sous sa forme cristalline en aiguilles paraissant groupées autour d'un axe : çà et là dans la corticale, des gouttelettes donnent la croix de polarisation. A cette température, on ne saurait confondre le complexe encore cristallisé et biréfringent avec les éthers du cholestérol et les phosphatides (V. PATZELT [256]).

Après ce refroidissement le complexe apparaît encore seul cristallisé, au milieu de gouttelettes présentant la croix de polarisation. Ce sont les éthers et les phosphatides qui sont demeurés liquides : leurs petites sphères liquides se déplacent, fusionnent entre elles, ce qui enlève alors tout intérêt à la préparation.

Un second moyen de caractériser le complexe est d'utiliser des *solvants*, capables de dissoudre les éléments lipidiques biréfringents sans toucher au complexe. A cette fin nous avons utilisé l'éther, mais les lipides fixés se dissolvent plus difficilement dans l'éther qu'on pourrait le croire; il faut changer deux fois au moins l'éther pour obtenir une coupe optiquement vide. Et les solvants organiques ne sont pas sans nuire, surtout lorsque leur action est répétée, sur l'état cristallin du complexe cholestérol-digitonine.

A la méthode des dissolvants se rattache l'emploi du *Soudan III*. Plusieurs auteurs signalent que la biréfringence des éthers du cholestérol ne résiste pas au Soudan, tandis que le bleu de Nil ne l'altère pas. Nous avons pensé que la différence de solvant de ces matières colorantes pouvait expliquer en partie ce phénomène curieux. Tandis que le bleu de Nil est utilisé en solution aqueuse, le Soudan s'emploie en solution dans l'alcool à 70°.

Dans une coupe colorée au Soudan, le complexe se détache plus brillant, inaltéré, sur un fond jaune orange, d'où les éléments biréfringents primitifs ont disparu, ou présentent tout au moins un éclat très atténué.

Quoiqu'il en soit, qu'on utilise la chaleur, les solvants ou les colorations, il faudra surtout développer les moyens d'améliorer l'examen au microscope polarisant. Les manuels de techniques (LANGERON [216], BEHRENS-KLEY [153]) indiquent la règle à suivre dans les cas où la biréfringence est minime.

La coupe a été montée sur une lame neuve, propre, sans défaut aucun, lame, lamelle, glycérine gélatinée doivent être soigneusement contrôlées à la lame de gypse (FIELD et ALSBERG [180]). Le microscope polarisant qui ne transmet environ que le quart de la lumière qu'on lui fournit (perte de lumière dans les nicols) doit être très éclairé. L'œil de l'observateur est abrité par un écran noir.

Enfin on pourra pratiquer l'observation en s'aidant d'une lame sensible donnant le rouge de premier ordre. Certains corps à réfringence très faible, pres-

que invisible entre les nicols croisés sont cependant décelables grâce à leur action sur la teinte de polarisation de la lame sensible.

B) TECHNIQUE PROPOSÉE.

Elle est **histo-physique** et **histo-chimique**. Elle combine l'emploi du **microscope polarisant** et la **réaction à la digitonine**. Elle permet de distinguer in situ le cholestérol de ses éthers et cela avec une certaine appréciation de quantité.

Le tissu à examiner, fixé au formol salé, est divisé en trois fragments.

a) L'un est coupé aussitôt, monté dans la glycérine gélatinée phéniquée avec ou sans coloration. Examiné au microscope polarisant, il est destiné à l'étude du tissu et à la localisation des éléments biréfringents primitifs.

b) Un autre fragment est immergé quelques heures dans l'alcool puis dans l'éther (5 cc. pour un fragment de 1 cm. sur 0,5 cm.), pendant 48 heures. Renouveler deux fois l'éther. Immerger ensuite dans l'alcool à 50° pendant 24 heures, et diviser en deux parties, l'une sera coupée aussitôt, pour montrer la nature lipidique des produits biréfringents de a), et l'autre, immergée dans la solution alcoolique de digitonine pendant dix jours. Les coupes issues de ce fragment ne devront pas contenir d'élément biréfringent.

c) Le dernier fragment sera immergé 10 jours dans la solution alcoolique de digitonine. On le divise ensuite en deux parties :

α) L'une est traitée par l'éther, qu'on renouvelle deux fois, en laissant en contact chaque fois 48 heures pour distinguer le complexe des éléments primitivement biréfringents.

β) L'autre est coupée à congélation. Les coupes, colorées au bleu de Nil ou au Soudan ou au R. Scarlach, ou non colorées sont montées et examinées. Elles contiennent à la fois les éléments biréfringents primitifs, et les cristaux du complexe.

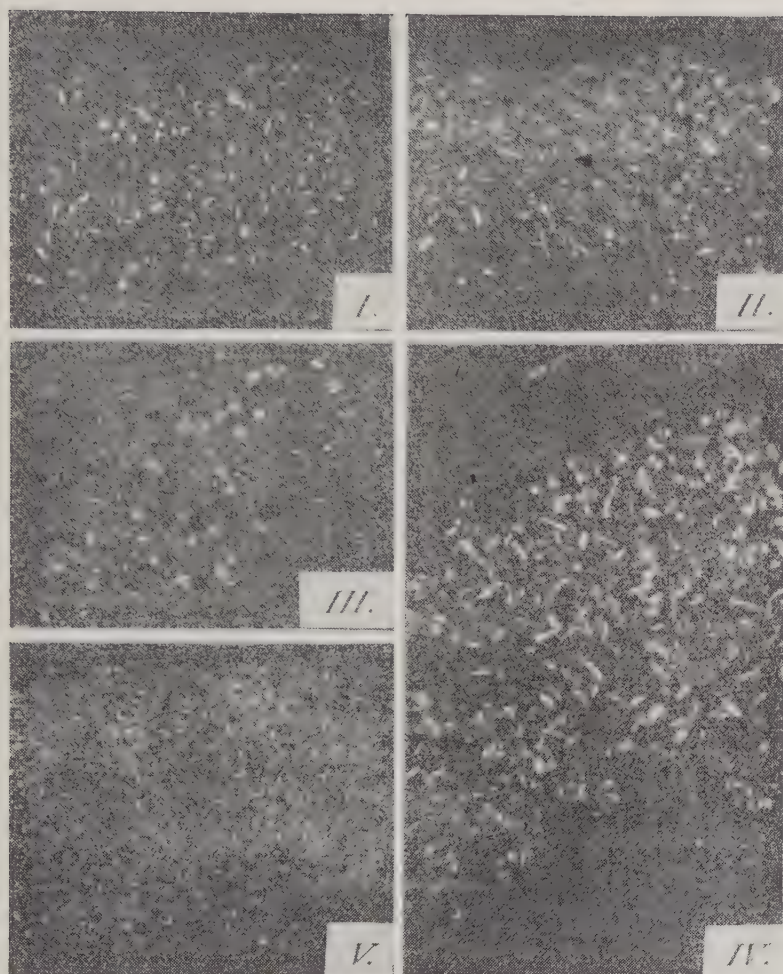
Il va sans dire que la technique précitée n'est à suivre entièrement que dans l'étude poussée d'un tissu. **En pratique, il suffira d'étudier une coupe de tissu neuf, et des coupes ayant subi l'action de la digitonine.**

C) RÉSULTATS ET CRITIQUE DE LA TECHNIQUE.

a) détection du cholestérol libre et éthérifié.

Après le traitement par la digitonine une coupe de surrénale de cobaye normal, de quelques mois, présente, en dehors des cristaux aciculés d'éthers du cholestérol, des rosettes d'aiguilles bien localisées, biréfringentes, insolubles, stables vis-à-vis de la chaleur.

Le complexe avec la saponine et la gaiac-saponine est plus brillant. C'est, dans les deux cas, un agrégat d'aiguilles en épis très biréfringentes, moins finement localisées. Aucune preuve ne peut être faite sur la nature de ces aiguilles, à cause de l'instabilité du complexe. Aussi émettons-nous quelques réserves quant à l'emploi de ces saponines, bien que le résultat qu'elles donnent paraisse, au premier abord, plus brillant.



Surrénales du Cobaye. Coupes par congélation

Microscope polarisant, nicols croisés. Microphotographies.

- I. Coupe de surrénale fraîche (Ethers du cholestérol). — II. Surrénale immergée 10 jours dans la solution alcoolique de digitonine (Ethers de cholestérol et complexe digitonine + cholestérol). — III. La même que fig. 2 et colorée au Soudan III (seul persiste le complexe cristallisé en rosette d'aiguilles). — IV. Surrénale immergée dans la solution alcoolique de saponine de Quillaya (agrandie : la zone médullaire est optiquement vide). — V. Surrénale immergée dans la solution alcoolique de gaiac saponine.

b) Répartition du cholestérol libre.

Nous avons vu que l'analyse chromatique, les réactions colorées, la méthode physique localisaient cholestérol et lipides dans la zone corticale. La méthode à la digitonine qui donne ses pleins résultats de détection du cholestérol libre lorsque les éthers sont masqués par un artifice quelconque, montre que le cholestérol *libre* paraît réparti de la même façon.

La surrénale de cobaye présente une abondance de rosettes d'aiguilles biréfringentes dans la corticale, tandis que la zone médullaire reste parfaitement obscure.

Mais la répartition dans la corticale n'est pas homogène; la zone glomérulaire est vide; tandis que la partie externe de la fasciculée est vraiment limitée par de nombreuses rosettes biréfringentes. Ces buissons d'aiguilles se font moins nombreux à mesure qu'on s'enfonce dans la corticale. La réticulée en est moins riche, et la zone réticulée interne fait une insensible transition par ses rares foyers lumineux avec la médullaire totalement obscure.

c) Critique de la méthode.

In vitro, la valeur de la précipitation n'était pas à discuter. Est-il permis d'accepter sans réserve les résultats lorsqu'il s'agit d'un tissu traité d'après la technique que nous préconisons ? Les erreurs possibles à la lecture de la coupe sont de deux ordres :

- 1°) confusion dans les cristaux biréfringents;
 - 2°) précipitation incomplète ou nulle.
- 1°) *Confusion*. — Les substances capables de don-

ner des cristaux biréfringents peuvent être celles qui existaient primitivement, et celles que le traitement a pu directement (complexe, digitonine) ou indirectement (cholestérol) faire apparaître.

Ecartons les éthers du cholestérol, qui par trop de caractères peuvent être distingués des cristaux en rosettes, écartons également les phosphatides, la digitonine qui cristallise difficilement, et que nous n'avons jamais rencontrée sur les coupes préalablement vidées d'éléments lipidiques biréfringents.

Il nous reste le complexe, dont nous connaissons les caractères, et accessoirement le cholestérol libre.

Au laboratoire, le cholestérol évaporé de ses solutions alcooliques ou éthérées, cristallise suivant le cas hydraté en tablettes, ou anhydre en aiguilles. Toutes ces formes sont très biréfringentes. Au contraire, dans un tissu, le cholestérol est très rarement cristallisé. Ce n'est que dans des cas anormaux, liquide des pleurésies à paillettes, calculs biliaires, qu'il est biréfringent, tandis qu'il est normalement sous une forme *continue*, c'est-à-dire dissimulée, invisible. Le cholestérol libre ne peut être une cause d'erreur. D'ailleurs, serait-il cristallisé, que ses aiguilles soyeuses, ou plutôt ses tables biréfringentes n'auraient rien de commun avec les aiguilles groupées du complexe.

2°) Peut-il y avoir erreur par *précipitation incomplète ou nulle* ? Les chimistes ont démontré que le complexe se forme même en présence d'éthers et que la sensibilité atteint 0,02 p. 100. Or, rares sont les

tissus qui ont une plus faible teneur en cholestérol libre.

L'erreur possible, c'est de laisser passer les cristaux par manque d'habitude : il ne faut pas oublier que leur biréfringence n'est pas du tout comparable à celle des éthers, mais leur forme est si caractéristique que cette erreur ne peut être qu'un défaut d'attention.

*

* *

Ainsi donc cette méthode est simple, précise et sûre. Elle localise étroitement le cholestérol libre et ses éthers. Les résultats qu'elle donne au sujet de la surrénale de cobaye s'accordent parfaitement avec ceux des méthodes précédentes.

Mais deux questions se posent :

Peut-on du cobaye inférer aux gros animaux ? Nos recherches histo-chimiques ont porté sur le cobaye, herbivore, rongeur, animal de laboratoire, et qui peut être un animal d'exception, tandis que les recherches correspondantes chimiques ont été effectuées sur des animaux de boucherie, tous herbivores, sauf le porc, mais dont les surrénales présentent certains caractères histologiques différents. Cependant il reste acquis que les auteurs admettent la similitude de plan de formation des capsules surrénales et de leur rôle physiologique et qu'il ne peut y avoir ici que des différences quantitatives qui n'intéressent ni la spécificité de la méthode ni les résultats finaux.

Sans doute les auteurs « n'ont pas obtenu de résul-

tats micro-chimiques pour les surrénales des bêtes à corne » (SORG ET JAFFÉ [273]), sans doute encore KAWAMURA [207] signale-t-il, chez les mêmes animaux, la présence de gouttes de graisse « réparties d'une façon homogène » dans les deux zones de la surrénale, il n'est pas moins certain que l'opinion classique, admise par tous les chercheurs, est la localisation presque exclusive des lipides dans la corticale.

Mais alors se pose une seconde question. Nous allons bientôt montrer, par les dosages chimiques, que la médullaire contient elle aussi du cholestérol libre, autant, et parfois plus que la corticale. On ne s'explique pas pourquoi ce cholestérol est indécélable par l'histo-chimie. On est en droit de se demander si le cholestérol médullaire n'est pas inclus dans un complexe qui le masque et le déroberait à ses réactifs, BIEDL [2] écrivait : « Les lipides surrénaux sont solubles les uns dans les autres, intermiscibles, d'où masqués et introuvables par les moyens habituels de l'histologie ». Cette dissimulation doit être le fait d'une combinaison solide puisque la digitonine elle-même ne peut l'en extraire, et cependant l'affinité de la digitonine est si forte pour le cholestérol qu'elle arrive à l'enlever au charbon qui l'a adsorbé.

En manière de conclusion, l'histo-chimie n'arrive à mettre en évidence que les lipides *libres*, c'est-à-dire, en dehors de toute combinaison. Ceci s'applique en particulier au cholestérol qui ne peut, en totalité libre ou éthérifié, être révélé que par la méthode chimique.

CHAPITRE III

RECHERCHES CHIMIQUES SUR LES LIPIDES DES CAPSULES SURRÉNALES DE MAMMIFÈRES

Il résulte des recherches antérieures aux nôtres que les capsules surrénales sont particulièrement riches en lipides. Mais les notions qualitatives et quantitatives qui découlent de ces travaux se rapportent à la *glande entière*, et les auteurs implicitement ou explicitement attribuent à la zone corticale la presque totalité des lipides, tandis que la zone médullaire est surtout considérée comme adrénalino-gène.

Dans nos recherches nous avons dosé séparément dans la médullaire et dans la corticale le cholestérol total, libre et éthérifié. Nous avons de même déterminé le phosphore lipidique et accessoirement le phosphore total : ces deux dosages offrant des relations intéressantes.

A. TECHNIQUES DE DOSAGE. RESULTATS

Le dosage du cholestérol total par colorimétrie, et celui du phosphore total se font sur des prises d'essai

différentes qui, après la pesée, peuvent attendre la mise en train pendant quelques heures. Par contre, le dosage pondéral du cholestérol et le dosage du phosphore lipidique s'effectuent souvent sur un même liquide d'extraction et les opérations doivent être menées rapidement. Les auteurs insistent particulièrement sur ce point, en raison des oxydations et de l'hydrolyse diastasiques qui insolubilisent et transforment les phosphatides.

I. Dosage du cholestérol.

Le dosage du cholestérol total s'effectue facilement et avec une précision relative par la méthode colorimétrique de GRIGAUT. Mais la distinction du cholestérol libre et du cholestérol éthérifié ne peut se faire que par la méthode de WINDAUS, méthode pondérale précise.

1) TECHNIQUE COLORIMÉTRIQUE (GRIGAUT [191]).

Le cholestérol des tissus extrait par l'éther après homogénéisation des tissus par l'alcool sodé au bain-marie est dosé en solution chloroformique en utilisant la réaction de LIEBERMANN-BULCHARD. On compare avec une solution chloroformique de cholestérol de titre connu et traitée dans les mêmes conditions.

a) La **prise d'essai**, 0,50 à 1 gr. de tissu, additionnée de 30 cc. d'alcool à 70° sodé à 1 p. 100, est introduite dans un petit erlenmeyer en pyrex de 100 cc. et placée au bain-marie bouillant. Le liquide contenant le fragment de médullaire noircit rapidement (adréna-

line), tandis que le fragment de corticale, en particulier chez le cheval, communique à la solution une coloration jaune plus ou moins accentuée (pigments). Il faut surveiller l'opération : il se produit parfois une mousse abondante qui peut s'échapper du récipient, ce qui occasionne des erreurs. Lorsque le volume du liquide a été réduit de moitié et que le tissu est entièrement dissous, on laisse refroidir et procède à l'extraction.

b) Extraction.

Le liquide est entièrement transvasé dans une ampoule à décantation. L'erlenmeyer est rincé deux fois avec 10 cc. d'éther; l'ampoule est bouchée et retournée trois fois avec précaution. Après un repos de 15 minutes, on décante et on lave avec 20 cc. d'eau qu'on fait glisser le long des parois de l'ampoule. Nouveau repos de 15 minutes. Si la ligne de séparation entre la couche éthérée et la couche aqueuse n'est pas nette, on la détermine en ajoutant une goutte de solution alcoolique de phtaléine du phénol. Il est bon d'effectuer un second lavage. La dernière décantation doit être effectuée lentement, en plusieurs fois, surtout vers la fin; il ne doit pas rester trace, après repos, de liquide aqueux au-dessus du robinet. A ce moment, l'ampoule bouchée et tenue dans la paume de la main est retournée, et le robinet brusquement ouvert. Le liquide aqueux retenu par capillarité dans le bec de l'ampoule est expulsé. On fait alors passer dans un petit cristalliseur de forme haute, le contenu de l'ampoule qui est lavée deux ou trois fois à l'éther. Cet éther de lavage est

naturellement joint aux autres liqueurs. On laisse s'évaporer le tout, doucement, à l'air libre.

c) Dosage.

Le résidu bien sec, généralement incolore est repris d'abord par 2 cc. de chloroforme qu'on introduit dans un tube de verre étroit et gradué à 5 cc. Le béccher est rincé plusieurs fois au chloroforme que l'on transvase dans le tube de verre pour compléter à 5 cc. En même temps, on introduit dans un autre tube gradué 5 cc. de solution témoin (solution chloroformique de cholestérol à 0,06 p. 100). Dans chacun des tubes on ajoute 2 cc. d'anhydride acétique, et *trois gouttes normales* d'acide sulfurique concentré et pur. On retourne les tubes. La coloration d'abord rose puis bleue passe rapidement au vert et atteint son maximum d'intensité après 25 minutes. On compare alors au colorimètre.

Soit p, la prise d'essai; t, le chiffre du colorimètre pour le témoin; s, le chiffre du colorimètre pour le tube en expérience : la quantité de cholestérol total contenu dans 1000 gr. de tissu frais est donnée par la formule :

$$\text{Cholestérol p. 1000} = \frac{0,003 \times t \times 1000}{p \times s}$$

Si nous avons fait figurer dans ce travail cette technique, tout à fait classique, c'est surtout pour insister sur les précautions nombreuses qu'elle demande et qui ont été très bien décrites par FRÉCHIN [183]. Pour qu'il y ait vraiment correspondance entre l'intensité de coloration et la teneur en cholestérol, il faut se mettre à l'abri de nombreuses causes d'er-

reur, car **beaucoup de facteurs influencent cette réaction.**

1°) La *lumière* active la coloration, c'est pourquoi AUTENRIETH et FUNK [147] opèrent la réaction dosimétrique dans l'obscurité tandis que SCHULTZ [272] en histochimie obtient les plus belles colorations sur les coupes longuement exposées à la lumière solaire.

2°) La *durée* est un facteur important et le dosage doit avoir lieu au moment de l'intensité maxima. La marche de la réaction vers son maximum varie avec la quantité d'acide sulfurique ajouté et sa qualité; aussi faut-il opérer de façon rigoureusement semblable et pour le témoin et pour le tube en expérience.

3°) Les *réactifs* sont le facteur essentiel. Le chloroforme doit être anhydre et sans alcool. Aussi le chloroforme anesthésique ne peut-il être utilisé. L'acide sulfurique doit être concentré et pur. On le distribue au compte-gouttes normal et jamais avec un flacon compte-gouttes qui « ramasse » l'humidité atmosphérique, et dont les premières gouttes ne sont qu'un acide fortement dilué. Il va sans dire que les tubes où se pratiquent la réaction doivent être absolument secs.

La technique de GRIGAUT employée en observant ces précautions donne des résultats satisfaisants. Elle nous a permis de mener à bien, en opérant par série de 4, un assez grand nombre d'expériences dont les résultats se révèlent d'une constance largement suffisante pour étayer nos conclusions.

*Répartition du cholestérol total
dans les capsules surrénales de Mammifères
(dosage colorimétrique).*

Cholestérol p. 1000 de tissu frais.

SURRÉNALES DE MOUTON.

	corti- cale	médul- laire		corti- cale	médul- laire		corti- cale	médul- laire
I	3.60	4.85		2.96 3.27	3.45 3.70		3.18	6.52
II	3.40	6.45					4.39	6.99
III	3.15	3.97		3.24 2.87	3.80	<i>a</i>	2.75	4.76
		3.97		2.56 2.12		<i>a</i>	2.73	6.52
	3.32	4.35						
	3.03	4.19	<i>a</i>	3.82	5.17	<i>a</i>	2.30	5.46
	3.04	4.30	<i>a</i>	3.15	5.11	<i>a</i>	3.66	4.86
	2.90	4.27						
	2.72	4.77	<i>a</i>	3.70 3.85	5.52	<i>a</i>	3.60	4.04
	2.95					<i>a</i>	3.52	4.10
				3.33	6.60			
	2.90	3.96				<i>a</i>	3.96	4.30
	2.14	3.60		3.75	6.18 5.83	<i>a</i>	3	4.68
	2.82	4.10				sg	3.19	4.97
	2.82	3.68				sd	2.60	4.19
	3.12	4.27						
	2.97							
	3.42							
	3.26							
	2.12	5.24						
	2.27	4.74						
SURRÉNALES DE CHÈVRE.								
			Ia	3.24	5.61	<i>a</i>	4.08	7.50
			II	5.60	5.30	<i>a</i>	3.84	5.01
				5.15	4.83			

SURRÉNALES DE BŒUF.

	corti- cale	médul- laire
	2.73	4.09
	2.94	
	3.90	3.75
	2.80	3.95
	2.77	4.05
	2.73	4.50
	3.80	4.58

SURRÉNALES DE CHEVAL.

	corti- cale	médul- laire		corti- cale	médul- laire
I	38.20	12.90		14.5	11.60
	34.07	14.8			
	38.10	18.84		23	15.80
				12.60	11.93
	7.60	9.2		16.40	14.15
IIa	8	8.33		23	17.30
				SURRÉNALES DE MULET	
IIIa	28.50	20	IV	18.5	11.7
	35	18			

SURRÉNALES DE VEAU.

	corti- cale	médul- laire
	4.77	6.52
	4.10	5.95
	4.28	5.35
	2.91	4.65
	3.46	2.80
	2.32	3.86
	3.33	4.47
	4.11	5.91
	4.95	6.21
	6.97	6.99

SURRÉNALES DE PORC.

	corti- cale	médul- laire		corti- cale	médul- laire
	7.85	6.53	II	8.10	6.30
				8.98	6.98
	18.70	6.49		6.90	
				11.30	
I	6.66	9.09			
	9.99	7.31			
	7.04	7.14	(sg)	9.96	7.69
			(sd)	6.25	8.17
(sg)	11.20	5.55			
(sd)	9.83	8.62		7.94	7.10
				7.88	9.30
(sg)	12.66	11.32			
(sd)	9.28	8.40			

LÉGENDE : Le dosage a été effectué soit séparément sur la surrénale droite (sd) ou la surrénale gauche (sg) du même animal (sd)-(sg), soit sur l'ensemble des deux surrénales du même animal (a), soit sur un lot moyen.

Lorsque divers dosages concernant à la fois les lipides et le phosphore ont été effectués sur un même lot, le numérotage des séries permet d'établir une comparaison.

2) TECHNIQUE PONDÉRALE (WINDAUS [289]).

Le cholestérol et ses éthers sont libérés de leurs combinaisons protéidiques par l'alcool bouillant, qui les dissout au cours d'une longue extraction dans l'appareil de Kumagawa. Le liquide d'extraction est souvent utilisé à la fois au dosage du cholestérol et au dosage du phosphore lipidique. La part destinée au dosage du cholestérol est divisée en deux : dans l'une, après purification, on précipite par la digitonine le cholestérol libre, et dans l'autre, après saponification et purification, on précipite le cholestérol total.

Tel est le principe de la méthode que MAYER et SCHAEFFER [234] ont utilisée dans leurs recherches, en combinant l'extraction au Kumagawa, et la précipitation par la digitonine :

a) Prise d'essai.

A partir de l'échantillon bien homogénéisé, on effectue une prise d'essai de 5 gr. environ, que l'on broie finement avec du sulfate de soude anhydre, jusqu'à obtention d'une poudre homogène. (Dans nos toutes premières expériences où seul le cholestérol était dosé, la pulpe après pesée était d'abord desséchée à l'étuve et pulvérisée ensuite avec du sulfate de soude anhydre. La pulvérisation était plus facile et la poudre fine qui en résultait s'épuisait plus rapidement, mais outre la perte de lipides qui peut se produire à l'étuve (TERROINE [276]), l'emploi ultérieur du même liquide d'extraction pour le

dosage du phosphore lipidique nous a fait abandonner cette pratique).

b) Extraction par l'alcool.

La poudre est introduite aussitôt dans une cartouche pour extraction dont la partie inférieure est déjà munie d'une couche de coton. La poudre elle-même est surmontée d'une mince couche de coton, qui doit être au moins à $\frac{1}{2}$ cm. du bord. Il ne faut pas trop tasser et laisser à la partie inférieure, entre la cartouche et son support, un espace de $\frac{1}{2}$ cm. au moins pour permettre le siphonage.

On introduit dans le ballon du Kumagawa 40 cc. d'alcool (1) à 95° et une bille de verre, et on fait glisser dans le col le porte-cartouche. On dispose le ballon, ajuste le réfrigérant, dont on a légèrement vaseliné la partie inférieure rodée qui bouche le ballon.

L'extraction est aussitôt mise en train. On la laisse se poursuivre régulièrement à raison d'une vingtaine de siphonages à l'heure pendant 12 heures. En réalité, 8 à 10 heures sont seulement nécessaires et ce n'est que par sécurité que l'opération est poussée à douze heures (2).

On transvase alors le liquide encore chaud dans un ballon jaugé de 55 cc., on rince le ballon d'extraction à l'alcool chaud, que l'on réunit au liquide ex-

(1) L'alcool à 95° par son point d'ébullition élevé est un meilleur solvant que l'éther ou le chloroforme.

(2) Nous avons à peu près régulièrement contrôlé l'extraction; même lorsque l'extraction n'a duré que 8 heures, la poudre résiduelle ne contient plus, après ce temps, trace de cholestérol.

tractif. On laisse refroidir et complète avec de l'alcool à 95° au trait de jauge.

Le contenu du ballon jaugé est ensuite réparti de la façon suivante :

20 cc. pour le dosage du cholestérol libre;

20 cc. pour le dosage du cholestérol total;

10 cc. pour le dosage du phosphore lipidique (voir plus loin).

1°) Pour doser le *cholestérol libre*, certains auteurs effectuent aussitôt la précipitation. Nous préférons pratiquer d'abord une reprise à l'éther. Le liquide est évaporé au demi et introduit dans une ampoule à décantation, ainsi que l'éther de lavage du ballon et 10 cc. d'eau pour favoriser la séparation des couches. Après deux lavages et deux décantations, la solution éthérée est finalement reçue dans un erlenmeyer et évaporée à siccité au bain-marie à 50° environ.

Le cholestérol libre est ainsi prêt à être précipité.

2°) Pour doser le *cholestérol total* il faut d'abord saponifier puisque la digitonine ne précipite que le cholestérol libéré de ses éthers. On introduit dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant (l'appareil de Kumagawa dont on a enlevé la cartouche, convient très bien), la solution alcoolique de cholestérol et une solution alcoolique de KOH N/25 en quantité variable suivant la teneur présumée en cholestérol éthérifié.

La saponification doit durer 2 h. à 2 h. 30, pendant lesquelles le liquide doit être maintenu à l'ébullition.

La saponification terminée, on distille l'alcool et

reprend le résidu par l'eau chaude acidulée par l'acide nitrique (LAUDAT [219]) qu'on transvase dans une ampoule à décantation ainsi que l'alcool éther qui a servi au lavage du ballon.

Les liquides sont épuisés à deux reprises par l'éther, et les solutions éthérées réunies sont lavées à l'eau, et après décantation évaporées au bain-marie. Le résidu contient le cholestérol total des 20 cc. de la prise d'essai.

c) Précipitation et pesée.

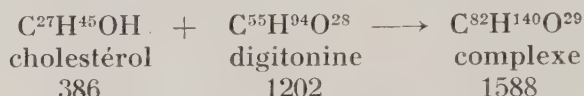
Dans les deux cas, cholestérol libre, ou total, on opère de la même façon. Le résidu de l'évaporation de l'éther est repris dans l'erlenmeyer par 25 cc. d'alcool absolu bouillant. On ajoute la solution de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool à 95 (on doit employer environ 4 à 5 fois plus de digitonine qu'il y a de cholestérol en solution, mais un trop grand excès est nuisible (CAMINADE [161])), et on maintient l'ébullition pendant deux minutes. Pour favoriser la précipitation il faut sortir l'erlenmeyer du bain-marie, et abaisser le titre de l'alcool par addition de 1 à 2 cc. d'eau distillée. Dans l'alcool à 90°, le précipité se forme aussitôt, on l'abandonne à lui-même pendant 24 heures.

Au bout de ce temps, on filtre sur un filtre taré disposé sur un entonnoir à longue douille. Le précipité est lavé (1) deux fois avec 5 cc. d'eau bouillante,

(1) Il importe de ne pas utiliser un trop grand volume de solvants pour le lavage car le complexe n'est pas entièrement insoluble dans l'eau bouillante, l'éther (MUELLER [249]) l'alcool fort (GARDNER ET WILLIAMS [185]).

une fois avec 10 cc. de réactif de CAMINADE (acétone, alcool, eau) et une fois avec 5 cc. d'éther. Après séjour de 30 minutes à l'étuve à 100° et refroidissement dans un exsiccateur, le filtre et son contenu sont pesés.

Le poids du précipité p' permet de calculer facilement la teneur de la solution en cholestérol.



d'où il ressort que $p' \times 0,2431$ donne le poids de cholestérol contenu dans les 20 cc. de la prise d'essai.

Si V est le volume de la solution alcoolique correspondant à la prise d'essai p tout entière, V' le volume de la partie aliquote utilisée au dosage du cholestérol, la teneur pour 1000 gr. de tissu frais sera donnée par la formule :

$$\text{Cholestérol p. 1000} = \frac{p' \times 0,2431 \times V \times 1000}{V' \times p}$$

Cette méthode est élective. Sa précision la fait rechercher dans les dosages rigoureux. Elle présente cependant deux inconvénients : le coût élevé de la digitonine (qu'on peut d'ailleurs récupérer) et la longueur des manipulations qui s'oppose à son utilisation en série.

*Repartition du Cholestérol libre et éthérifié
dans les Capsules Surrénales de Mammifères.
(dosage pondéral)*

SURRÉNALES DE MOUTON.

		Cholestérol pour 1000 de tissu frais.			Rapports	
		Libre	Ethérifié	Total	L/T	E/T
	corticale.	3.23	0.30	3.53	92	8
	médullaire.	5.91	0.41	6.32	93	7
	corticale.	3.685	0.917	4.602	80	20
	médullaire.	5.01	0.096	5.106	98	2

SURRÉNALES DE CHÈVRE.

III	corticale.	2.58	0.49	3.07	84	16
	médullaire.	5.30	0.08	5.38	98	2
	corticale.	3.60	0.18	3.78	95	5
	médullaire.	5.54	0.44	5.98	92	8
IV	corticale.	3	0.37	3.37	89	11
	médullaire.	4.78	0.11	4.89	97	3

SURRÉNALES DE BŒUF.

	corticale.	3.98	0.01	3.99	99	1
	médullaire.	5.59	0.30	5.89	94	6
III	corticale.	4.04	0.20	4.24	95.3	4.7
	médullaire.	4.86	0.42	5.28	92	8

SURRÉNALES DE VEAU.

		Cholestérol pour 1000 de tissu frais.			Rapports	
		Libre	Ethérifié	Total	L/T	E/T
I	corticale.	3.01	0.49	3.50	86	14
	médullaire.	4.11	0.52	4.63	89	11
V	corticale.	2.84	0.54	3.38	84	16
	médullaire.	4.13	0.61	4.74	87	13
VI	corticale.	3.38	1.07	4.45	76	24
	médullaire.	4.99	0.28	5.27	94	6

SURRÉNALES DE CHEVAL.

III	corticale.	4.94	28.36	33.30	15	85
	médullaire.	4.64	15.67	20.31	22	78
	corticale.	4.23	13.17	17.40	24	76
	médullaire.	5.54	7.66	13.20	42	58
VI	corticale.	5.18	16.22	21.40	24	76
	médullaire.	5.05	1.18	6.23	81	19
IV Mulet	corticale.	6.33	12.19	18.52	33	67
	médullaire.	5.87	3.30	9.17	64	36

SURRÉNALES DE PORC.

	corticale.	2.76	5.66	8.42	32	68
	médullaire.	4.06	3.59	7.65	53	47
III	corticale.	4.73	2.45	7.18	65	35
	médullaire.	4.83	1.21	6.04	80	20

II. Dosages du phosphore total et du phosphore lipidique.

Dans la glande surrénale, le phosphore peut se rencontrer, comme par ailleurs dans d'autres organes, sous différentes formes étudiées et précisées par JAVILLIER et ses collaborateurs [204]. Il y a : d'abord le phosphore minéral dont la détermination exacte paraît très délicate, sinon impossible à cause de la fragilité des autres formes qui en libèrent sous les moindres influences; ensuite le phosphore appartenant aux phosphatides; enfin le phosphore nucléique dont le dosage a été tenté par JAVILLIER et ALLAIRE [201]. Il resterait une forme phosphorée organique d'existence probable, mais indéterminée, et l'on peut schématiser ces faits de la façon suivante :

$$P \text{ total} = P \text{ lipidique} + P \text{ nucléique} + \underbrace{P \text{ indéterminé}}_{P \text{ inconnu} + P \text{ minéral}}$$

Nous n'avons effectué que le dosage du phosphore total et du phosphore des lipides, écartant la détermination du phosphore nucléique. La méthode de JAVILLIER utilisée par JAVILLIER et ALLAIRE [201] pour doser le phosphore nucléique de la surrénale entière, a le mérite d'atteindre directement le phosphore des nucléines. Malheureusement elle paraît manquer encore quelque peu de certitude comme il ressort des critiques de POSTERNAK [262] et comme JAVILLIER [200] lui-même l'a reconnu.

Pour doser correctement le phosphore lipidique il faut extraire tous les lipides à l'exclusion de toute

substance étrangère pouvant contenir l'ion P. Or la seule garantie repose sur la solubilité des lipides dans certains solvants, en l'espèce l'alcool. L'extrait doit être purifié à l'aide de l'éther anhydre puis minéralisé par le mélange nitro-sulfurique. A partir de ce stade la technique est la même que celle suivie pour doser le phosphore minéral. Il faut donc en résumé se livrer aux opérations suivantes :

$$P \text{ LIPIDIQUE} \left\{ \begin{array}{l} 1^{\circ} \text{ extraction et purification} \\ 2^{\circ} \text{ minéralisation} \\ 3^{\circ} \text{ dosage proprement dit} \end{array} \right\} P \text{ TOTAL}$$

Pour la commodité de l'exposition nous décrirons l'opération qui intéresse le phosphore lipidique et qui implique dans ses deux derniers temps le dosage du phosphore total.

1°) **Extraction et purification.**

L'extraction est souvent destinée en même temps au dosage du cholestérol par la méthode de WINDAUS, ainsi que nous l'avons dit précédemment. Lorsqu'elle n'a en vue que la détermination du P lipidique, la prise d'essai est de un à deux grammes de tissu frais; la rapide mise en train, et le montage de l'appareil se font comme il est indiqué à propos du WINDAUS. Le temps d'extraction peut être un peu réduit, puisqu'il y a une quantité moindre de substance. LEMELAND [223] indique 6 à 8 heures, JAVILLIER [204] préconise 8 heures.

Il faut suivre la technique de LEMELAND [222] qui donne d'excellents résultats et qui est aujourd'hui généralement adoptée. Elle part de ce fait que l'ex-

trait alcoolique contient tous les lipides phosphorés, mais peut contenir d'autres substances phosphorées, non lipidiques et dont il faut se débarrasser. La simple reprise par l'éther et le benzène (1) du résidu d'évaporation de la solution alcoolique (évaporation qui doit avoir lieu dans des conditions bien déterminées) donne d'après LEMELAND le phosphore lipidique total, « les résultats obtenus avec un même solvant sont toujours très concordants ».

Le produit de l'extraction alcoolique est transvasé dans un ballon en pyrex de grande capacité, puis évaporé dans un vide de 20 mm. au moins, sur un bain-marie chauffé vers 70°. Au moment où il ne reste plus dans le ballon qu'un alcool très étendu, et que des mousses se produisent on interrompt l'évaporation, et l'on met dans le ballon un peu d'alcool (2) à 95°. On refait le vide et concentre à un volume de 4 ou 5 cc. On introduit alors 10 cc. d'alcool absolu avec une pipette, en rinçant le col et les parois du ballon. On refait le vide à 15 ou 20 mm. et seulement alors on plonge le ballon dans l'eau bouillante en agitant constamment. En deux ou trois minutes on obtient un résidu très sec et réparti en couche mince sur les parois du ballon.

Ce dernier temps du séchage est d'une importance

(1) La reprise par le benzène est inutile pour la surrénale qui ne paraît pas contenir de sphingomyéline, lipide phosphoré insoluble dans l'éther (LEMELAND [223]).

(2) Pour éviter toute rentrée d'air, le ballon est fermé par un bouchon traversé par un tube à robinet. Pour faire pénétrer l'alcool, on adapte au tube à robinet un entonnoir muni d'un petit tube de caoutchouc : l'alcool entre seul, tout danger d'oxydation est écarté.

capitale. L'exactitude de la méthode en dépend absolument. « Un chauffage à 100° des phosphatides du sérum en présence d'air les rend insolubles dans leurs solvants ordinaires et le résultat obtenu perd toute signification ».

On introduit alors 30 à 40 cc. d'éther anhydre (conservé sur sodium) et chauffe 5 minutes à reflux, laisse déposer et décante. On pratique trois extractions semblables. LEMELAND indique de réunir ces liqueurs, de les évaporer des 2/3 environ. Le 1/3 restant est centrifugé, et le liquide décanté et évaporé : c'est le résidu de cette dernière évaporation, constitué par les lipides phosphorés qu'on minéralise ensuite.

Au lieu de centrifuger, nous avons préféré filtrer sur coton dégraissé, quelque peu tassé. Le filtrat limpide recueilli dans un petit ballon de Kjeldahl en pyrex est évaporé, et le résidu minéralisé.

2°) Minéralisation.

Ici commencent les opérations applicables également au dosage du phosphore total; (dans ce cas la prise d'essai a été de 0,50 à 1 gr. de tissu frais).

Nous avons minéralisé par la méthode nitro-sulfurique dite (1) de NEUMANN. Dans le matras de Kjeldahl de 100 cc., qui contient déjà le résidu phosphoré ou le tissu, on introduit 2 cc. d'acide sulfurique concentré et pur, et 5 cc. d'acide nitrique (ces réactifs exempts de phosphore) et une bille de verre. On chauffe doucement (BAUMANN [151]) et lorsque le

(1) En réalité cette méthode a été d'abord préconisée et précisée par MILLON [242] et ensuite et indépendamment par L. LAPICQUE [217].

ballon est rempli de vapeurs nitreuses on dispose dans le col un petit entonnoir. Peu à peu la substance se dissout, mais l'opération n'est achevée qu'après une phase colorée à laquelle succède une phase à peine teintée de jaune. Parfois, on doit ajouter au ballon refroidi et qui contient un liquide brun, quelques gouttes d'acide nitrique. En chauffant doucement quelques minutes le liquide se décolore. L'opération demande environ deux heures. On laisse alors refroidir, ajoute 50 cc. d'eau distillée et fait bouillir quelques minutes pour transformer les acides pyro et méta-phosphorique qui ont pu se former en acide ortho-phosphorique seul justiciable de la méthode au molybdate.

3°) Dosage proprement dit.

L'acide phosphorique est précipité sous forme de phospho-molybdate d'ammonium. Le précipité lavé, débarrassé de toute trace d'acidité, est dissous dans de la soude titrée et en excès. Après avoir chassé l'ammoniaque et laissé refroidir, on titre avec l'acide sulfurique en présence de phtaléine.

Le produit de la minéralisation et les eaux de lavage du ballon sont transvasés quantitativement dans un bécher en pyrex de 100 cc., de façon à avoir un volume de 40 à 50 cc. de liquide. Additionner de 20 cc. d'une solution de nitrate d'ammonium à 50 %, et introduire dans le bécher; chauffer à 70-80° et, à ce moment, ajouter 10 cc. d'une solution de molybdate d'ammonium à 10 % préparée à froid et filtrée. A l'aide d'un agitateur, qui restera dans le

bécher jusqu'à la fin de l'opération, agiter le liquide, sans toucher aux bords du bécher. Un trouble, suivi d'un précipité jaune, se forme et se dépose bientôt, granuleux. Laisser le bécher au repos 20 minutes dans de l'eau glacée.

Il faut ensuite laver le précipité. Pour cela on décante le liquide sur un filtre mince, genre filtre sans cendres, non plissé, et placé dans un entonnoir à douille longue, et dans lequel on a fait passer de l'eau glacée pour resserrer les pores. Décanter tout le liquide en entraînant le moins possible de précipité sur le filtre. Le précipité résié dans le bécher est lavé à l'eau glacée par décantation à plusieurs reprises, jusqu'à ce qu'une goutte du filtrat ne rosisse plus le papier de tournesol bleu sensible.

A ce moment, on dépose le filtre et son contenu dans le bécher où l'on introduit 20 cc. d'eau distillée pour mettre par agitation le précipité en suspension. On dissout le précipité dans la soude N/10 en quantité connue et en excès (excès de 5 cc. au moins). On note le nombre exact de cc. de soude N/10 employés.

On porte à l'ébullition pendant 15 à 20 minutes jusqu'à ce que le liquide ne dégage plus d'ammoniaque (contrôle au papier de tournesol sensible, ou au Nessler à l'extrémité d'un agitateur, ce qui est beaucoup plus sensible).

Après refroidissement sous un courant d'eau, on ajoute quelques gouttes de solution alcoolique de phtaléine du phénol, qui doit rougir fortement le liquide. A l'aide d'un jet de pissette, on lave les pa-

rois du bécher dans lequel on fait tomber ensuite goutte à goutte et en agitant, une solution d'acide sulfurique N/10, placée dans une burette graduée au 1/20 de cc., jusqu'à complète disparition de toute coloration rose (1).

Nos résultats sont évalués en P^2O^5 pour 1000 de tissu frais. Si p est la prise d'essai, n le nombre de cc. de soude N/10 utilisés, n' le nombre de cc. d'acide sulfurique N/10, le phosphore évalué en P^2O^5 pour 1000 de tissu frais nous est donné par la formule :

$$P^2O^5 \text{ pour 1000} = \frac{(n - n') \times 0,000253 \times 1000}{p}$$

(1) La méthode de NEUMANN-GREGERSEN fait ajouter à ce moment un volume de SO^4H^2 N/10 égal à celui de la soude N/10 employée. Après une courte ébullition pour chasser CO^2 , on titre en retour avec la soude N/10.

*Répartition du phosphore
dans les Capsules surrénales de Mammifères.*

Résultats exprimés en P_2O_5 pour 1000 de tissu frais.

SURRÉNALES
DE MOUTON.

	corti- cale	médul- laire
I	10.20	13.33
II	11.23 10.01	14.40 16.02
III	9.35 9.78 9.59 9.12	13.30 12.57 12.28 11.14
	9.76 9.96	11.01 11.50
IV	10.50	11.05

SURRÉNALES
DE CHÈVRE.

	corti- cale	médul- laire
Ia	9.02	11.20
a	10.40	13.40
IIa	9.61 9.53	11.30 11.20
	9.66 9.59	10.45

SURRÉNALES
DE CHEVAL.

	corti- cale	médul- laire
I	9.80 10.01 9.93	10.54 10.87 10.56
II	10.80 10.10	11.80 11.40
sd	10.06 10	12.40 13.20
sg	10.79 11.62	14.99 14.56
V	9.40	10.40
SURRÉNALES DE MULET		
IV	10.2	10.7

SURRÉNALES
DE VEAU.

I	9.88 10.52	11.97 12.49
V sg	10.10	12.07
sd	10.83	12
II a	10.92	12.53
III a	11.11	12.12
IV a	10.27	12.16

SURRÉNALES
DE BŒUF.

I	10.44 10.94	12.94 12.16
II	11.28 11.13	14.31 13.92
IV	9.20	10.40

SURRÉNALES
DE PORC.

I	12.60 12.20	13.07 13.04
II	10.90 12.14	12.02 12.80

*Répartition du phosphore lipidique
dans les Capsules surrénales de Mammifères.*

Résultats exprimés en $P^{2}O^{5}$ pour 1000 de tissu frais.

SURRÉNALES
DE MOUTON.

	corti- cale	médul- laire
IV	3.87	3.79
	4.34	3.76

SURRÉNALES
DE CHÈVRE.

	corti- cale	médul- laire
III	4.17	3.27
	3.88	3.24
IV	4.64	4.20

SURRÉNALES
DE CHEVAL.

	corti- cale	médul- laire
VI	4 4.18	
V	3.94	3.48
IV Mulet	5.26	4.22

SURRÉNALES
DE VEAU.

I	4.89	4.44
V	4.69	4.44
	5.27	4.94
	5.39	5.10

SURRÉNALES
DE BŒUF.

III	4.17	3.73
	4.49	3.39
IV	4.89	3.57

SURRÉNALES
DE PORC.

III	4.95	3.82
	4.45	3.63
	4.59	3.56

B. DISCUSSION DES RESULTATS

I. Cholestérol, cholestérol libre et éthérifié

1. — LES METHODES ET LES RESULTATS

Il nous a été permis de comparer une fois de plus les chiffres de cholestérol total que fournissent les deux méthodes colorimétrique et pondérale. Comme les déterminations ont été effectuées sur des tissus où le cholestérol n'est pas uniformément réparti, mais localisé dans certaines zones cellulaires, on ne pouvait pas s'attendre d'emblée à une parfaite concordance. En effet, les chiffres que donnent ces deux méthodes sont quelque peu différents mais cette différence est toujours étroitement limitée (cheval, séries III, IV).

Pour cette même raison, découlant de la difficulté d'obtention d'une prise d'essai rigoureusement homogène, plusieurs dosages colorimétriques effectués à partir du même échantillon moyen, donnent parfois des écarts qui peuvent être importants chez certains animaux (cheval).

Il apparaît que, dans l'étude du contenu cholestérolique des tissus, la méthode colorimétrique et la méthode pondérale ont chacune leur destination propre; lorsqu'un grand nombre de résultats sont nécessaires pour étayer une conclusion, la méthode colorimétrique est préférable parce que rapide, suffisamment exacte et moins onéreuse. La méthode pondérale au contraire convient aux dosages rigoureux et

différentiels, car elle seule permet de distinguer dans le cholestérol total ce qui revient au cholestérol libre et au cholestérol éthérifié.

2. — REPARTITION DU CHOLESTEROL TOTAL DANS LA CAPSULE SURRENALE DE MAMMIFERES

D'après les résultats analytiques enregistrés on peut distinguer parmi les surrénales étudiées, d'une part, celles des Ruminants, caractérisées par une *teneur faible et constante* en cholestérol total, et ceci aussi bien dans la médullaire que dans la corticale, et d'autre part celles du cheval et du porc où le cholestérol existe en *quantité importante et variable*.

Nous retrouverons dans d'autres circonstances, ces différences de composition entre les surrénales des Ruminants, et les surrénales du cheval et du porc.

a) Les surrénales fraîches du mouton, de la chèvre, du veau et du bœuf, contiennent en effet fort peu de cholestérol dont le taux dans la corticale est voisin de 4 gr. par kilog et de 5 gr. dans la médullaire. Par contre, on en trouve jusqu'à 40 gr. dans la corticale et 20 gr. dans la médullaire de cheval.

Ces chiffres concernant les deux zones séparées s'accordent pleinement avec ce que les auteurs ont noté pour la glande entière. Nous avons vu en effet que BABÈS et JONESCO [149], WOODHOUSE [291], SORG et JAFFÉ [273] insistaient sur la pauvreté en cholestérol des surrénales du gros bétail; et MAYER, MULON et SCHAEFFER [232] avaient distingué la surrénale

« maigre » du mouton, de la surrénale « grasse » du cheval. Leurs chiffres qui justifient ces formules correspondent parfaitement aux nôtres.

** Répartition du Cholestérol total
dans les Capsules surrénales de Mammifères.*

Cholestérol p. 1000 gr. de tissu frais.

MOYENNES COLORIMÉTRIQUES.

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale	3.10	4.38	3.09	4.12	22.88	9.44
médullaire.	4.79	5.65	4.12	5.27	14.19	7.73

MOYENNES PONDÉRALES.

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale	4.06	3.40	4.11	3.77	22.65	7.80
médullaire.	5.71	5.42	5.58	4.86	12.30	6.85

Au point de vue de la teneur en cholestérol total, la surrénale de cheval se rapproche de celles du cobaye (60 gr.), du chat (50 gr.), de l'homme (50 gr.). La glande de porc fait une sorte de transition entre celle du cheval et les surrénales des Ruminants, qui, en somme, paraissent ne pas contenir plus de cholestérol que les autres organes.

Les Ruminants forment un groupe homogène : d'espèce à espèce le taux de cholestérol moyen sem-

ble invariable, la zone corticale et la zone médullaire ont chacune un chiffre propre et commun aux différentes espèces.

b) Chez les différents individus d'une même espèce, les *variations* sont minimales lorsqu'il s'agit de surrénales appartenant à des Ruminants, appréciables chez le porc, considérables chez le cheval.

Le tableau des chiffres extrêmes (obtenus par la méthode colorimétrique) permet d'en suivre l'amplitude.

*Variations de la teneur en Cholestérol
des deux zones des Surrénales de Mammifères.*

CHIFFRES COLORIMÉTRIQUES EXTRÊMES.

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale	2.12 à 4.39	3.24 à 5.60	2.73 à 3.90	2.32 à 6.97	7.60 à 38.20	6.25 à 18.70
médullaire.	3.45 à 6.99	4.83 à 7.50	3.75 à 4.58	2.80 à 6.99	8.33 à 20	5.55 à 11.32

Le contenu cholestérolique des glandes du cheval présente des oscillations analogues à celles que l'on note chez le cobaye (MOURICUAND et LEULIER [245]) ou chez l'homme sain (de 26 à 66 gr. FEX [179]); tandis qu'on ne trouve chez le porc que des variations beaucoup plus limitées. Ces variations ne paraissent d'ailleurs pas en relation évidente avec l'état d'engraissement de l'individu.

c) L'étude chimique de la répartition du cholesté-

rol à l'intérieur de la surrénale est un fait nouveau (LEULIER et REVOL [226]).

La glande tout entière contient du cholestérol en plus ou moins grande quantité suivant les régions et suivant les espèces animales.

Des deux zones principales, c'est la médullaire qui est toujours la plus riche chez les Ruminants. Chez ces animaux, où chacune des zones a une teneur constante, le chiffre qui désigne la médullaire est voisin de 5, tandis que celui de la corticale dépasse d'assez peu 4.

Chez le porc et le cheval, la répartition est différente et quoique les chiffres soient très variables, il apparaît que la corticale est généralement la zone la plus riche. Lorsqu'une surrénale de cheval contient de grandes quantités de cholestérol, il semble bien en effet que la zone corticale en renferme la plus grande partie, mais toujours, et ceci mérite d'être noté, la médullaire présente alors également une forte surcharge de cholestérol total et contribue de façon très notable à la richesse de la glande (séries I, III chez le cheval).

Les résultats chimiques quantitatifs s'opposent aux résultats qualitatifs de l'histochimie, qui est incapable de révéler, dans des glandes surrénales bourrées de cholestérol, l'existence du cholestérol médullaire (LEULIER et REVOL [227]).

d) Nous avons essayé de pousser plus loin nos recherches et de localiser par microdissection et dosage le cholestérol à l'intérieur du tissu cortical. Il paraissait en effet intéressant de comparer aux données his-

tochimiques concernant la corticale, les résultats chimiques donnés par des animaux de différentes espèces.

La zone corticale a été séparée en deux parties, en pratiquant une section au milieu de la fasciculée. Malgré les aléas que comporte cette opération délicate et difficile, les résultats sont suggestifs.

		<i>Cholestérol par kilog de tissu frais.</i>			
		Bœuf	Porc	Cheval	
<i>corticale.</i>	<i>externe</i> (capsule externe, glomérulaire et fasciculée externe)	4.68	6.94	8.59	15.07
	<i>interne</i> (fasciculée interne et réticulée).	4.02	11.30	16.20	38.1
<i>médullaire.</i>		4.92	4.33	8.33	20

Chez le porc, plus encore chez le cheval, la corticale interne retient la plus forte proportion de cholestérol et chez le bœuf, elle en contient une quantité très voisine, sinon égale.

Or, l'histo-chimie, qu'il s'agisse des colorations, de la méthode physique, ou de la méthode à la digitonine, ne détecte, dans la surrénale de cobaye, le cholestérol libre ou éthérifié, que dans la fasciculée et la réticulée; si on considère que la surrénale de cheval présente, quant à son contenu cholestérolique, des rapports évidents avec la glande du cobaye, il faut conclure que l'histo-chimie semble détecter plus spé-

cialement le cholestérol que la chimie permet de considérer comme **substance de dépôt**. C'est ce que confirme ce fait que la corticale de bœuf, où la méthode histochimique ne détecte pas de cholestérol, révèle au point de vue chimique, une répartition presque homogène des composés cholestéroliques.

Ceci montre que cet essai de séparation tout conventionnel*semble cependant reposer sur une réalité. Chez le cheval, la corticale interne regorge de cholestérol, et ce cholestérol présente ses réactions caractéristiques qui permettent de le déceler in situ. La corticale externe, la médullaire de cheval, la glande tout entière du bœuf contiennent également du cholestérol et souvent même en quantité notable, mais celui-ci apparaît indécélable directement par les méthodes histochimiques.

3. — REPARTITION DU CHOLESTEROL LIBRE ET ETHERIFIE DANS LES CAPSULES SURRENALES DE MAMMIFERES

Les chiffres de cholestérol éthérifié divisent à nouveau les espèces. Les éthers presque inexistants chez les Ruminants adultes (les surrénales de veau en présentent de façon plus appréciable) occupent chez le porc et davantage encore chez le cheval une place de tout premier plan. *Les éthers sont donc essentiellement variables*. Au contraire, *le cholestérol libre reste fixé* à un taux voisin, soit dans la corticale, soit dans la médullaire chez tous les animaux

étudiés et apparaît comme un élément constant, caractéristique (LEULIER et REVOL [226]).

a) En examinant de près les tableaux des résultats de la méthode pondérale, on est surpris de la faible quantité d'éthers des surrénales de Ruminants. Le rapport du cholestérol éthérifié au cholestérol

total $\frac{E}{T}$ ne dépasse pas 8 % chez le bœuf. Ce rapport atteint exceptionnellement 16 % chez la chèvre, 20 % chez le mouton et devient un peu plus important chez le veau, où il oscille entre 14 et 24 % dans la corticale, 6 et 13 % dans la médullaire. Tout ceci correspond aux données histochimiques de KAWAMURA [207] qui signale quelques enclaves biréfringentes dans les capsules surrénales de veau, alors que la glande de bœuf se montre complètement obscure à la lumière polarisée.

Nous avons trouvé chez le porc une sorte de transition, les rapports $\frac{E}{T}$ et $\frac{L}{T}$ se rapprochent, tandis que dans la surrénale de cheval le cholestérol libre n'atteint plus par rapport au cholestérol total, que de maigres proportions (15 à 24 p. % dans la corticale, 33 % chez le mulet), car la glande est gorgée d'éthers. Il est bien permis de penser que le cholestérol spécialement localisé dans certaines régions de la corticale et décelé après microdissection par la méthode colorimétrique, est presque entièrement formé d'éthers, comme aussi la méthode histophysique semble l'indiquer.

Il ne faudrait cependant pas croire que dans ces

surrénales riches en cholestérol éthérifié, les éthers soient strictement localisés dans la corticale. La médullaire elle aussi en est pourvue. Ainsi, dans l'un des dosages effectués chez le porc, la relation $\frac{E}{T}$ atteignait 68 p. % dans la corticale et 47 p. % dans la médullaire. Chez le cheval, elle arrive presque à 80 p. %.

Il apparaît donc clairement que, dans les surrénales riches en cholestérol total, la zone médullaire renferme elle aussi des proportions importantes de cholestérol éthérifié.

b) La question est d'un intérêt croissant lorsque l'on considère que le **cholestérol éthérifié** est éminemment **variable** d'un animal à l'autre et plus encore d'une espèce à l'autre, tandis que le **cholestérol libre** apparaît étonnamment **fixe** chez tous les animaux étudiés.

*Répartition du Cholestérol libre et éthérifié
dans les Capsules Surrénales de Mammifères.*

MOYENNES

	Cholestérol	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale.	libre.	3.45	3.06	4.01	3.07	5.17	3.74
	éthérifié.	0.61	0.34	0.10	0.70	17.48	4.05
	total.	4.06	3.40	4.11	3.77	22.65	7.79
médullaire.	libre.	5.45	5.21	5.22	4.41	5.27	4.45
	éthérifié.	0.25	0.21	0.36	0.47	6.95	2.40
	total.	5.70	5.42	5.58	4.88	12.22	6.85

Il forme la presque totalité du cholestérol des capsules surrénales de Ruminants, contrairement aux données de ROSENHEIM et TEBB [270] qui n'avaient pas trouvé de cholestérol libre dans les capsules de ces animaux. Chez le cheval il n'entre que pour une faible part dans le chiffre élevé du cholestérol total, soit de la corticale, soit de la médullaire.

Si on compare les chiffres de cholestérol libre, chez les différents animaux étudiés, on les trouve très voisins les uns des autres : corticale et médullaire sont caractérisées chacune par un chiffre de cholestérol libre qu'on retrouve partout à un taux presque constant : le cholestérol libre dans la corticale est limité entre 3,06 (chèvre) et 4,01 (bœuf) (le cheval cependant atteint 5,17), tandis que dans la médullaire il oscille entre 4,41 (veau) et 5,45 (mouton), qui sont des chiffres extrêmes.

Le cholestérol libre se retrouve dans la corticale et la médullaire de tous les animaux, dans le même rapport que le cholestérol total dans les deux zones des surrénales des Ruminants. Le cholestérol libre paraît un peu plus important dans la médullaire que dans la corticale.

Cette constance du cholestérol libre dans la surrénale, entrevue par LANDAU [215] apparaît comme nettement démontrée.

Il nous semble qu'elle se vérifie chez d'autres animaux car FEX [179] trouve dans la glande entière de l'homme et WOODHOUSE [291] dans celle du cobaye des chiffres de cholestérol libre rapprochés des nôtres.

L'élément essentiellement variable est la forme éthé-

rifiée du cholestérol. C'est elle qui fait la richesse en cholestérol des surrénales de certains animaux, richesse qui ne s'explique pas d'ailleurs par l'apport alimentaire, ainsi que le croyaient SORG et JAFFÉ [273] : l'aspect tout différent des chiffres du cheval et du bœuf est significatif à ce point de vue.

c) Autre conclusion : la médullaire apparaît toujours la plus riche en cholestérol libre; lorsque les éthers abondent dans la corticale, ils existent également dans la médullaire. Pourquoi l'histo-chimie n'est-elle pas en accord avec la chimie ? Pourquoi le microscope polarisant nous révèle-t-il chez le cobaye seulement les enclaves lipidiques de la corticale, alors que, d'une manière vraisemblable, la médullaire en est elle-même chargée ? Pourquoi la méthode à la digitonine est-elle impuissante à nous révéler le cholestérol libre de la médullaire, alors qu'elle nous donne pour la corticale des résultats positifs ?

Les lipides cholestéroliques de la médullaire sont masqués à leurs réactifs habituels. Nous avons pensé qu'ils pouvaient être dissimulés dans un complexe. De nombreux travaux (GARDNER et GAINSBOROUGH [184], MACHEBŒUF [229]) ont démontré que la plus grande partie des lipides du sang étaient inclus dans des complexes stables, et perdaient en même temps certaines des propriétés permettant leur diagnose directe. Ces complexes sont solubles dans l'eau; les solvants organiques au contraire ne leur arrachent pas trace de lipides.

Escomptant qu'il pouvait y avoir un rapport entre les complexes lipidiques de MACHEBŒUF et le cholestérol

térol « virtuel » et invisible des surrénales, nous avons réalisé des expériences simples, uniquement basées sur des solubilités dans l'eau.

1) EXTRACTION PAR L'EAU

La macération de capsules surrénales de mouton pulpées (corticale et médullaire séparées) dans l'eau *physiologique*, à 0° pendant 24 heures, donne un liquide qu'on divise en deux parties : l'une est soumise directement à l'extraction par l'éther et l'autre à l'action de l'alcool sodé à chaud et à l'extraction par l'éther. Les opérations se terminent par une réaction colorimétrique. L'action directe de l'éther est sans résultat, tandis qu'après action de l'alcool sodé, des traces de cholestérol peuvent être mises en évidence, particulièrement dans la médullaire.

Une macération effectuée dans les mêmes conditions mais dans l'eau *hypertonique* (15 % de sel marin) dans le but de coaguler les protéines, donne des résultats négatifs, cependant on réussit à caractériser une très petite quantité de cholestérol, issu de la corticale.

Une macération identique, mais dans l'eau *distillée*, permet d'identifier des traces de cholestérol provenant de la médullaire (extraction directe par l'éther) et de petites quantités dans les deux zones, après action de l'alcool sodé.

Dans l'eau légèrement *bicarbonatée*, il ne passe pas trace de cholestérol directement soluble dans l'éther, par contre des quantités appréciables (1/50

environ du cholestérol total) peuvent être mises en évidence après action de l'alcool sodé.

Les mêmes expériences effectuées sur des surrénales de cheval dont la composition chimique est toute différente, donnent des résultats sensiblement analogues.

Ces résultats ne comportent pas de conclusion nette: ils semblent indiquer cependant que le cholestérol n'entre pas dans une combinaison soluble dans des liqueurs aqueuses différentes hypo, iso ou hypertoniques et à différents pH, qu'il s'agisse de corticale ou de médullaire.

2) EXTRACTION PAR L'ÉTHER.

Nous avons envisagé le problème sous une autre face. Le complexe de MACHEBŒUF soluble dans l'eau ne cède pas à l'éther trace de cholestérol, même après plusieurs semaines de contact. Le même solvant n'enlève au sang qu'une très faible proportion de cholestérol. Il paraissait intéressant de connaître l'action directe de l'éther sur les surrénales, et de voir si le cholestérol des deux zones se comportait de façon identique.

a) Degré de solubilisation.

On laissait trois jours en contact quelques grammes de tissu avec 50 cc. d'éther. L'éther décanté était évaporé et le résidu d'évaporation soumis au dosage. En traitant le reste du tissu par l'alcool sodé à chaud, le complément du cholestérol total pouvait être déterminé.

	Cheval		Cheval		Mouton	
	<i>Cholestérol p. 1000 de substance fraîche.</i>					
	trouvé	reste	trouvé	reste	trouvé	reste
corticale. ...	8	traces	40	traces	3.3	traces
médullaire ..	5.5	2.25	26	traces	6.6	traces

En trois jours, tout le cholestérol surrénal passe dans l'éther.

b) Vitesse de solubilisation.

En opérant sur un même lot de capsules pulpées, il était intéressant de voir si le cholestérol des deux zones était extrait dans le même temps. •

Le tissu était ensuite homogénéisé après action du solvant, et le reste du cholestérol dosé. Les chiffres ci-dessous représentent le rapport cholestérol solubilisé en un temps donné au cholestérol total.

durée de contact de l'éther.	Rapport du cholestérol solubilisé au chol. total.					
	Cheval			Mouton		
	45'	3 h.	18 h.	45'	4 h.	
corticale	18	40	56	27	46	
médullaire	30	45	87	40	91	

Contrairement à ce que nous aurions pu penser, c'est le cholestérol médullaire, masqué à ses réactifs histochimiques, qui se dissout le mieux et le plus vite dans l'éther.

Toute hypothèse de complexe lipo-protéidique analogue à celui du sang, en vue d'expliquer la dissimulation du cholestérol médullaire, nous paraît devoir être actuellement abandonnée.

II. Phosphore lipidique et phosphore total.

1. — LES METHODES ET LES RESULTATS

La méthode dite de NEUMANN de minéralisation et de dosage du *phosphore total* a été suffisamment étudiée en chimie pour que, en observant avec soin la technique, notamment dans la conduite de la minéralisation, le lavage du précipité et la titration en retour, cette méthode donne d'excellents résultats. La constance des données de deux dosages effectués sur la même prise d'essai prouve encore la valeur de la méthode. Cependant, lorsqu'on l'utilise comme micro-méthode, elle paraît susceptible de donner des erreurs en excès. C'est du moins ce que dit LEMELAND [223] qui conseille de partir de prises d'essai contenant au moins 2 mmgr. de phosphore. Ce n'est que très rarement que nos prises d'essai ont été de l'ordre de 2 mmgr. et au-dessous; si bien que les erreurs en excès, inhérentes à l'emploi de la méthode, sont limitées à fort peu de chose.

Il est une autre cause d'erreur également par excès qui peut affecter les plus élevés de nos résultats, c'est l'erreur provenant de la dessiccation de la substance au cours de la dissection des zones.

Mais comme les dosages ont été effectués en même temps sur des prises d'essai sensiblement égales des deux zones, qui ont subi parallèlement le même temps de dessiccation, les chiffres relatifs de la médullaire et de la corticale restent comparables et c'était bien là notre but.

L'extraction du *phosphore lipidique* selon LEMELAND convient parfaitement à condition de suivre rigoureusement sa technique. Il nous est arrivé d'effectuer sur le même échantillon deux extractions : les chiffres de phosphore lipidique, obtenus après la série de manipulations que l'on connaît sont extrêmement voisins et témoignent de la valeur de la technique.

La notion de phosphore lipidique selon LEMELAND est, on le sait, toute conventionnelle. Elle ne représente pas véritablement le phosphore des lipides seuls, puisqu'elle englobe une petite quantité de substances organiques phosphorées non lipidiques. C'est cependant la meilleure dans l'état actuel des choses et, ces restrictions étant posées, elle correspond à une donnée physiologique sûre.

2. — PHOSPHORE TOTAL

a) Les surrénales des Mammifères ont une *teneur* phosphorée importante qu'on peut fixer aux envi-

rons de 11 gr. de P_2O_5 par kilog d'organe frais. Selon LEMATTE, BOINOT et KAHANE [221] qui déterminèrent les coefficients de minéralisation des organes, il n'y a guère que le thymus, le cerveau et les testicules qui aient un indice plus élevé. Par ailleurs, JAVILLIER [204] donne des teneurs analogues.

Cependant il faut signaler que nos chiffres de phosphore total sont plus élevés que ceux des auteurs ainsi qu'en témoigne le tableau suivant :

Animaux	Phosphore total en P_2O_5 p. 1000 gr. de tissu frais.			
	Glande entière			Zones séparées
	MAYER, MULON et SCHAEFFER [232]	JAVILLIER [204] [203]	LEMATTE [221]	(moyennes de nos résultats)
Cheval	7.75	7.91		C = 10.24
	5.4	7.22		M = 11.94
Mouton	10.30	10	7.56	C = 9.95
	9.5			M = 12.67

Il pourrait se faire que cette différence entre nos chiffres et ceux des auteurs, vienne, ainsi que nous l'avons précédemment signalé, du dessèchement inévitable du tissu au cours de la dissection, avant la pesée.

b) Comparons la teneur des surrénales en phosphore total suivant les espèces. Les moyennes nous renseignent sur ce point. Qu'il s'agisse de l'une ou de l'autre des zones, les chiffres ne diffèrent que légèrement. Le phosphore de la corticale est compris

entre 10 et 12 gr., celui de la médullaire entre 11 et 13 gr. JAVILLIER [204] avait déjà remarqué pour la glande totale cette faible variation (ses chiffres extrêmes, calculés comme les nôtres, varient seulement de 7,82 pour le bœuf, à 10 pour le mouton).

*Répartition du phosphore
dans les Capsules Surrénales de Mammifères.*
Moyennes (en P_2O_5 p. 1000 gr. de tissu frais).

PHOSPHORE TOTAL

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale.	9.95	9.63	10.59	10.52	10.24	11.96
médullaire.	12.67	11.51	12.74	12.19	11.94	12.73

PHOSPHORE LIPIDIQUE

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale.	4.10	4.23	4.51	5.06	4.34	4.66
médullaire.	3.77	3.57	3.56	4.73	3.85	3.67 *

c) La répartition du phosphore total à l'intérieur de la surrénale est quelque peu surprenante. Partout, sans exception, la médullaire se révèle légèrement plus riche. C'est surtout lorsque les dosages portent sur un animal isolé (veau) ou sur une surrénale isolée (cheval) que cette différence est visible. Elle ne dépasse cependant pas 20 %. Elle est parfois minime

(porc) mais comme elle existe toujours, on ne peut incriminer une erreur expérimentale.

Il nous est donc permis d'admettre que le phosphore total existe à un taux constant dans les deux zones, mais qu'il est en proportion un peu plus forte dans la médullaire.

3. - PHOSPHORE LIPIDIQUE

Le phosphore lipidique se rattache plus directement à l'étude des lipides, puisqu'il est le témoin certain de la présence de lipides phosphorés. L'abondance exceptionnelle du phosphore lipidique dans la surrénale, sa constance, et sa répartition presque uniforme dans l'organe donne à cette étude un relief particulier.

a) JAVILLIER [204] notait que de tous les organes où le taux de phosphore des lécithines était connu, la surrénale était la plus riche, après la moelle et la substance grise. D'ailleurs, les chiffres de JAVILLIER, calculés en P^{205} sont assez voisins des nôtres.

		P ²⁰⁵ p. 1000 de substance fraîche			
		Mouton	Bœuf	Veau	Cheval
JAVILLIER [204] Glande totale		4.39	4.83	3.65	3.49
Nos chiffres	{ cort.	4.10	4.51	5.06	4.34
	{ méd.	3.77	3.56	4.75	3.85

Par contre, MANCEAU [230] a trouvé chez le cobaye des chiffres très différents.

b) Ainsi que plusieurs auteurs, MAYER et SCHAEFFER [237], TERROINE [277] pour divers organes et JAVILLIER [204] pour la surrénale entière, l'avaient signalé, le chiffre de phosphore lipidique de chaque zone évolue dans un cadre étroit. Ses variations sont plus limitées encore que celles du phosphore total, notamment d'animal à animal. Mais il ne faut pas perdre de vue que la plupart de nos dosages de phosphore lipidique ont été effectués sur des lots moyens, et qu'ils représentent de ce fait, à eux seuls, de véritables moyennes, tandis que le phosphore total est souvent dosé chez un seul individu, parfois même dans une seule surrénale.

c) Enfin, comme pour le phosphore total, la répartition du phosphore lipidique dans la surrénale est un peu inégale, mais cette fois, c'est la corticale qui semble plus riche. Les chiffres de la corticale et ceux de la médullaire sont sensiblement dans le rapport $\frac{4}{3}$.

Il y a cependant par kilog plus de 3 gr. de P^{205} lié aux lipides dans la médullaire et là encore, l'histo-chimie semble incapable de les détecter.

Les résultats concernant la répartition du phosphore total et du phosphore lipidique dans la surrénale permettent de poser une question. Sous sa forme totale, le phosphore est plus abondant dans la médullaire; sous sa forme limitée de « lécithines »,

il est plus spécialement localisé dans la corticale. La médullaire apparaît donc comme la plus riche en phosphore inconnu. N'est-il pas permis de penser que cette forme indéterminée peut partiellement appartenir à une combinaison protidique spéciale en relation avec la substance active de la médullaire, l'adrénaline. Ceci n'est évidemment qu'une simple hypothèse, qu'il serait intéressant de vérifier expérimentalement. L'adrénaline « virtuelle » repose peut-être sur un substratum nucléique, qui la dissimule primitivement à ses réactifs.

III. Essais d'établissement des constantes des zones surrénales.

On n'a jamais établi jusqu'ici d'indices caractérisant chacun des tissus surrénaux. Les travaux de MAYER et SCHAEFFER, de TERROINE et leurs collaborateurs, n'ont jamais porté sur les constantes cellulaires des glandes surrénales. JAVILLIER et ses collaborateurs ne se sont occupés que du phosphore et de ses différentes formes. A la faveur de nos recherches qui comprennent le dosage et la répartition d'un plus grand nombre d'éléments, nous apportons de nouveaux indices susceptibles de classer la surrénale et surtout d'en distinguer nettement les deux zones.

CHOLESTÉROL LIBRE
1. LE RAPPORT —————
PHOSPHORE LIPIDIQUE
CARACTÉRISE DANS UNE ESPÈCE DONNÉE CHACUNE
DES DEUX ZONES SURRÉNALES.

Il n'a pu être question pour nous d'établir le coefficient lipocylique $\frac{\text{cholestérol}}{\text{acides gras}}$, le dosage des acides gras n'ayant pas été effectué. Au contraire, le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{P lipidique}}$ nous est accessible. Mais quelle valeur pourrait avoir ce rapport, puisque le cholestérol total varie selon les différents animaux étudiés, alors que le phosphore lipidique reste sensiblement fixe. Il semble bien que ce coefficient n'ait de valeur que pour l'animal inanitié, c'est-à-dire lorsque l'élément variable a disparu. Or, l'élément variable est représenté par les éthers du cholestérol, et l'élément fixe par le cholestérol libre. Il suffit de substituer au cholestérol total, le cholestérol libre, pour obtenir un indice très important distinguant dans une espèce donnée, la corticale de la médullaire.

Ainsi le démontre le tableau suivant :

*Le coefficient $\frac{\text{cholestérol libre}}{\text{phosphore lipidique}} \times 100$
comme indice caractéristique des tissus surréniaux,
dans une espèce donnée.*

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale.	84	72	88	60	119	80
médullaire.	144	145	146	93	136	121

CHOLESTÉROL LIBRE
2) LE RAPPORT $\frac{\text{---}}{\text{---}}$
PHOSPHORE TOTAL
NE PRÉSENTE Q'UN INTÉRÊT RELATIF.

Si nous examinons le coefficient $\frac{\text{cholestérol libre}}{\text{P total}}$
on voit qu'il ne subit lui-même que des variations faibles et que les chiffres donnés par la corticale avoisinent ceux fournis par la médullaire. Ceci s'explique, car *ces deux éléments* sont en proportion légèrement plus élevée dans cette dernière zone.

PHOSPHORE LIPIDIQUE
3) LE RAPPORT $\frac{\text{---}}{\text{---}}$
PHOSPHORE TOTAL
ÉVOLUE DANS D'ÉTROITES LIMITES ET DISTINGUE
LA CORTICALE DE LA MÉDULLAIRE.

Enfin le rapport des deux formes phosphorées déterminées, caractérise étroitement corticale et médullaire. Tandis que $\frac{\text{P lipidique}}{\text{P total}} \times 100$ varie de 28 à 38 pour la médullaire, il est naturellement plus élevé dans la corticale, où il va de 39 à 48. JAVILLIER [204] qui l'a déterminé pour la glande totale, avait trouvé de 38 à 54.

Phosphore lipidique
Le coefficient $\frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100$
Phosphore total
comme élément de caractérisation des tissus surrénaux.

	mouton	chèvre	bœuf	veau	cheval	porc
corticale.	41	43	42	48	42	39
médullaire.	29	31	28	38	32	28

Ce qu'il faut surtout retenir de l'étude des lipides surrénaux c'est la *constance* du *cholestérol libre* et du *phosphore lipidique*, éléments d'équilibre des tissus, et la *variabilité énorme des éthers du cholestérol*.

QUATRIÈME PARTIE

RÉPARTITION DE QUELQUES
AUTRES ÉLÉMENTS DANS LES
CAPSULES SURRÉNALES

SOUFRE ET SURRENALES

CHAPITRE PREMIER

LE SOUFRE ET LES CAPSULES SURRÉNALES ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION

C'est assez récemment qu'on s'est occupé de la question du soufre surrénalien. Les traités classiques de chimie biologique la laissent entièrement de côté. C'est ainsi qu'ARMAND GAUTHIER [7], HUGOUNENQ [9], LAMBLING [10] n'en font même pas mention. Cependant le soufre a été dosé dans certaines glandes endocrines et dans le muscle, mais les chiffres ne sont généralement donnés que dans un but statistique, sans chercher à les rapporter à la physiologie de l'organe. Ça et là on rencontre pourtant quelques notes récentes sur le soufre surrénalien : LÆPER et ses collaborateurs envisagent, les premiers, la part que jouent ces glandes dans le métabolisme du soufre.

A. LES PROCEDES D'ETUDE

Le soufre des organes a été le plus souvent dosé sous sa forme totale. Il n'est en effet pas facile de

distinguer entre les diverses modifications sous lesquelles le soufre existe dans l'organisme. Le soufre des tissus se présente soit sous une forme complètement oxydée : soufre dit *acide* des sulfates et des dérivés sulfo-conjugués; soit sous une forme dite *neutre*, dont l'oxydation est incomplète : soufre organique des albumines, de la cystine, de la taurine.

En dosant le soufre total et le soufre dit acide, on a par différence le soufre dit neutre.

Une substance soufrée, ou mieux un groupe de substances soufrées fait aussi l'objet d'un dosage spécial : c'est le groupe du glutathion, peptide de l'acide glutamique.

1. DOSAGE DU SOUFRE TOTAL.

Le dosage du *soufre total* comporte deux temps : minéralisation et dosage proprement dit :

a) La **minéralisation** est la phase qui demande le plus d'attention. En chimie organique, on utilise la méthode de CARIUS, procédé long et délicat, mais le seul aussi qui donne des résultats parfaitement exacts.

G. BERTRAND [296] rejette la calcination simple et préconise, en dehors de la méthode de CARIUS, « la meilleure », dit-il, la minéralisation mixte par l'acide nitrique fumant à chaud, complétée ensuite par l'action des nitrates et carbonates alcalins à haute température.

La méthode de LIEBIG (d'après MEYER [328]) qui date de 1835, est une fusion alcaline en présence de salpêtre. Elle donne de bons résultats très compa-

rables entre eux. LESURE [313] l'a utilisée dans quelques-unes de ses expériences. Nous aurons l'occasion d'en reparler.

En chimie biologique, on tend de plus en plus à simplifier les méthodes au double point de vue du temps et du matériel. Aussi d'autres réactifs, à action plus puissante et plus rapide, sont bientôt utilisés pour la minéralisation des produits soufrés : l'acide perchlorique [312], le perhydrol [315] [330], associés à l'acide nitrique fumant.

LEMATTE, BOINOT et KAHANE [312] emploient le mélange nitro-perchlorique (acide nitrique fumant 100, acide perchlorique pur 50, eau distillée 100) en vue du dosage des éléments minéraux des poudres opothérapiques. En 10 à 15 minutes, la minéralisation est effectuée.

LESURE et DUNEZ [314] utilisent les mêmes réactifs mais l'action porte sur le produit préalablement desséché à basse température, épuisé ensuite au Soxhlet par l'éther, et le dosage final du soufre minéralisé s'effectue volumétriquement.

b) Il y a en effet plusieurs façons de **doser** le soufre une fois minéralisé.

Comme, au cours de cette opération, il a été entièrement transformé en acide sulfurique, la simple addition de chlorure de baryum précipite le sulfate de baryum qu'on peut peser, ou bien encore l'addition de benzidine précipite le sulfate de benzidine, insoluble à froid et qui s'hydrolyse à l'ébullition, de sorte que l'opération se termine par un simple dosage acidimétrique. Ces deux méthodes ont donné

l'une et l'autre de bons résultats à ceux qui les ont employées.

La méthode pondérale est un peu longue et assez délicate. Si le produit minéralisé contient des nitrates, il est prudent de les éliminer : leur présence empêcherait partiellement la précipitation du sulfate de baryum (HINGLAIS [305]), mais la méthode pondérale se montre supérieure à la méthode volumétrique parce que plus générale et plus précise.

L'emploi de la méthode à la benzidine se heurte en effet à quelques difficultés : le sulfate de benzidine est soluble à froid dans l'eau chargée de nitrates et de chlorures alcalins. Aussi les modes de minéralisation qui introduisent dans la substance nitrates et alcalins sont-ils à éliminer. Elle convient cependant, d'après LESURE et DUNEZ [314] au dosage du soufre dans les organes en minéralisant par l'acide nitro-perchlorique, à condition de reprendre ensuite par l'acide chlorhydrique. « Les résultats sont très satisfaisants, approchés de la méthode pondérale ».

Cependant, la multiplicité des techniques proposées reposant sur des bases identiques, indique que ces procédés ne donnent pas toujours entière satisfaction. D'ailleurs il suffit de comparer les chiffres donnés au sujet du même tissu d'un même animal, étudié par le même chimiste, avec des techniques différentes : les chiffres extrêmes sont entre eux comme 1 et 40 (LÆPER [319]). Souvent on a voulu simplifier et gagner du temps; les résultats s'en sont ressentis et ne présentent généralement qu'une va-

leur très relative, comme le reconnaissent d'ailleurs les auteurs eux-mêmes.

2. DOSAGE DU GLUTATHION.

A côté du soufre total, on a dosé le *glutathion*, ou comme le fait remarquer LÆPER [320] ce qu'on désigne sous ce nom et qui fait partie d'un « soufre organique quelconque ». Dans la surrénale, BLANCHETIÈRE et ses collaborateurs [298] l'ont déterminé par la méthode de TUNNICLIFFE [335] basée sur l'oxydation du groupe — SH par l'iode en solution titrée en présence de nitroprussiate, indicateur externe. Bien que cette méthode ait été légitimée par HOPKINS lui même qui découvrit le glutathion [307], elle a fait l'objet de critiques de la part de nombreux auteurs (THOMPSON et VOETGTILIN [334], Mme RANDOIN et R. FABRE [331] qui en précisent la technique). D'après BLANCHETIÈRE [297] si « les réactions employées pour déceler cette présence ne paraissent pas spécifiques de ce peptide, elles s'appliquent sans aucun doute à tous les corps analogues qui renferment le groupement — S H... D'autre part, la similitude des propriétés physico-chimiques de ces substances, fait que les raisonnements généraux gardent toute leur valeur ».

B. REPARTITION.

LOCALISATION DES PRODUITS SOUFRES

C'est avec les méthodes précédentes plus ou moins modifiées que les auteurs ont établi quelques chiffres

concernant la répartition du soufre dans les tissus. Il va sans dire que les multiples méthodes donnent des résultats d'une variabilité étonnante qui ne permet pas de se faire une idée même relative de la teneur moyenne d'un tissu en soufre.

Cela ne serait rien si les auteurs spécifiaient, dans l'exposé de leurs résultats, quelques points importants. La plupart du temps on ne sait pas exactement s'il faut rapporter les chiffres à 100 ou à 1.000 de tissu frais ou sec, ou à la glande totale, et si le résultat a été calculé en S, SO^3 , SO^4 , SO^4H^2 , SO^4Ba . On comprend aisément, qu'en raison de la variabilité des résultats pour un même tissu, si l'un de ces facteurs manque, le chiffre perd toute signification.

1. SOUFRE TOTAL

a) *Répartition.* — Aussi nous bornerons-nous à citer les résultats de soufre total exprimés avec précision; tels sont ceux de LOEPER [319] et qui sont exprimés en SO^3 pour 100 gr. de tissu sec.

	foie	rein	peau	surrénales
SO^3	0,91	0,05	0,78	0,025; 0,068;
%		à 0,15	à 0,90	0,19; 0,80; 1,10
tissu sec				
ce qui, traduit en S pour 100 de tissu sec, devient :				
S	0,36	0,02	0,31	0,32
%		à 0,06	à 0,36	et 0,44
tissu sec				

Le soufre des surrénales semble, d'après ces chiffres, subir d'importantes variations; mais il y a tout lieu

de croire que les trois premiers chiffres qui ne figurent pas dans les notes ultérieures de LOEPER proviennent d'erreurs d'expérience. Les deux derniers semblent seuls à retenir.

LEMATTE, BOINOT et KAHANE donnent, à l'occasion de leur étude du contenu minéral des produits opothérapiques [312], des chiffres de soufre total qu'il nous paraît intéressant de reproduire partiellement ici (les résultats sont exprimés en SO^4H^2 pour 1000 de tissu frais et pour 100 gr. de tissu sec).

SO^4H^2	Bœuf	Vache	Mouton			Porc			
	muscle	ovaire	hypophyse	capsules surrénales	thyroïde	foie	rein	pancréas	rate
0/00 frais	6.233	3.065	4.12	3.59	3.946	4.296	4.83	4.72	3.98
% sec	2.71	1.648	1.66	1.643	1.518	1.404	2.066	1.24	1.60

Ce tableau permet de comparer la teneur en soufre des surrénales avec celle d'autres endocrines et du muscle.

D'autres auteurs donnent également des résultats se rapportant aux capsules surrénales. LURIE [327] cite un de ses élèves, FOLDES qui a trouvé 1, 52 % chez le rat, sans ajouter de précisions; il cite aussi d'autres résultats, avec moins de commentaires encore : AUFRECHT et DIESING auraient publié le chiffre de 3,67 pour 100...

Il est préférable de s'en tenir aux chiffres de LOEPER et à ceux de LEMATTE, que l'on peut résumer en ce qui concerne la surrénale en exprimant les résultats en S pour 1000 de glande fraîche : pour LOEPER (1) 0,8 à 1,1 gr., pour LEMATTE 1,17 gr., chiffres qui sont en somme assez voisins.

LOEPER et ses collaborateurs [319] ajoutent que 80 p. 100 environ de ce soufre sont à l'état de soufre neutre; ils n'indiquent pas comment, dans ce cas particulier, il a pu obtenir ce chiffre.

b) *Localisation.* — LOEPER a poussé plus loin ses recherches : il a localisé le soufre dans l'organe. En 1926 [318] il pensait que la corticale était un peu moins riche que la médullaire; mais par un raisonnement quelque peu hasardé, il est conduit à admettre que la corticale est en réalité plus riche que la médullaire [320]. Le chiffre trouvé pour la médullaire est 1,1, et pour la corticale 0,8 (en SO³ p. 100 de produit sec) [313], mais « étant donnée la richesse plus grande en albumine de la médullaire et en lipoides de la corticale, la charge des albumines corticales est plus grande que celle de la médullaire » [323].

Ce raisonnement repose sur une hypothèse gratuite qui demanderait quelques vérifications.

Toujours d'après LOEPER [319] la plus grande partie de ce soufre est organique, puisque, calculé pour

(1) Les surrénales renferment environ 75 % d'eau (chiffres de JAVILLIER [203] et sensiblement les nôtres). Les résultats de LOEPER sont exprimés en SO³ pour cent de tissu sec; pour les transformer en S pour 1000 de tissus frais nous les avons multipliés par $(\frac{32}{80} \times \frac{10}{4})$ c'est-à-dire par l'unité.

100 gr. de tissu sec, le soufre acide atteint 0,06 dans la corticale, 0,065 dans la médullaire.

2. GLUTATHION

a) *Répartition.* — Ces points, localisation et nature des substances soufrées, offrent une certaine concordance avec les faits notés par BLANCHETIÈRE et ses collaborateurs au sujet de la répartition du *glutathion* dans les organes et sa localisation à l'intérieur de la surrénale.

Parmi toutes les glandes étudiées chez le chien (BLANCHETIÈRE et LÉON BINET [298]) la surrénale est la plus riche en glutathion. La glande fraîche en contient de 4 à 6 gr. par kilog, alors que le foie qui vient ensuite, n'en a guère plus de 3,50. En évaluant le glutathion en soufre, il apparaît que la glande fraîche renferme par kilog 0,64 de soufre appartenant à un système — SH; et ceci montre que plus de la moitié du soufre surrénalien serait à l'état de glutathion.

b) *Localisation.*

BINET et GIROUD [295] ont réussi à localiser le glutathion à l'intérieur de la surrénale. Leur technique micro-chimique, basée sur la réaction au nitroprusiate, leur a permis d'établir que la corticale est particulièrement riche en glutathion.

C. SOUFRE ET SURRENALE

En vue d'expliquer les diverses théories émises au sujet du rôle des surrénales dans le métabolisme du soufre, il importe de résumer succinctement ce que l'on sait de ce métabolisme (FLURIN [302]).

1. MÉTABOLISME DU SOUFRE.

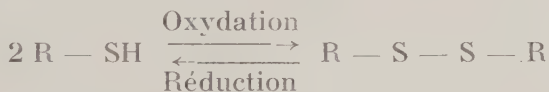
Le soufre, d'origine exogène (aliments) ou endogène (tissus) existe dans les organes sous forme de soufre acide ou de soufre neutre. On peut schématiser l'anabolisme dans la formation d'albumines diverses, dans lesquelles le soufre est dit neutre. Ce soufre neutre (catabolisme) par des processus variés se désintègre et s'élimine sous forme oxydée de soufre acide.

La modification intéressante est celle du soufre neutre. C'est elle seulement que l'organisme pourra utiliser. C'est elle seulement qui est capable de donner d'intéressantes réactions d'oxydo-réduction dont l'importance biologique est considérable. Ces propriétés réactionnelles avaient été étudiées après J. B. DUMAS, par de REY PAILHADE en 1888 [332]. Cet auteur avait établi que la levure de bière était capable de transformer le soufre en hydrogène sulfuré, et que cette propriété était partagée par de nombreux tissus vivants. Il donna le nom de *philothion*, à ce qu'il crut d'abord être un ferment, et que par la suite, il reconnut être une matière albuminoïde, à « hydrogène labile » ; de REY PAILHADE observa enfin que

plus un tissu produit d'hydrogène sulfuré, plus il consomme d'oxygène. Ces vues étonnantes furent confirmées par HOPKINS [306] au cours des recherches qui aboutirent à l'isolement du glutathion (1921).

D'abord HOPKINS le considère comme un dipeptide de l'acide glutamique et de la cystéine. Mais devant les observations de HUNTER et EAGLES [310], HOPKINS découvrit que le glutathion était en réalité un tripeptide résultant de l'union de trois acides aminés l'acide glutamique, la cystéine, et la glycine [308].

La glutathion jouit, comme la cystéine avec laquelle on l'a longtemps confondu, de la propriété d'être très instable. Il existe sous deux formes : l'une, le glutathion *réduit* dans laquelle une fonction sulfhydrile est libre et qui en cela correspond à la cystéine, l'autre qui résulte de la facile oxydation de la forme précédente et de la soudure de deux molécules de glutathion réduit avec perte d'hydrogène. C'est le glutathion *oxydé* qui correspond à la cystine.



Or, le moindre facteur de réduction transforme la forme disulfure en forme sulfhydrile.

Le glutathion est, dans son cadre, le produit le mieux connu. Il existe parmi les matières protéiques des corps dont la capacité réactionnelle, c'est-à-dire la capacité d'oxydo-réduction, est encore plus grande, et « il y a tout lieu de penser, écrit BLANCHETIÈRE [298], que la réactivité du soufre cystinéique aug-

mente avec la complexité de la molécule dans laquelle il est engagé ».

Des faits expérimentaux nombreux sont venus préciser le rôle du soufre peptidique (JOHNSON et VOEGTLIN [311]). In vitro, l'absorption d'oxygène par les tissus, en présence de glutathion, est considérable (MEYERHOF [329]). La forme réduite est transformée en forme oxydée, et le surplus d'oxygène intervient dans l'oxydation tissulaire. Le glutathion et les peptides soufrés en général, par leur capacité d'oxydation et de réduction, catalysée sans doute par les infiniments petits chimiques, jouent un rôle important dans l'organisation chimique des tissus (R. FABRE [301]). Mais « les conditions d'action de ces produits restent en grande partie à préciser » (DAMAS [300]).

Nous avons vu que ces peptides rentrent dans le cadre du soufre neutre, et que les localisations du glutathion et du soufre neutre, semblent correspondre dans la surrénale. Comme cette glande renferme, d'après LÉPER, particulièrement du soufre neutre, le rôle de la surrénale dans le métabolisme du soufre semble très actif.

2. RÔLE THIOPEXIQUE DE LA SURRÉNALE.

La surrénale fixe le soufre. Le fait paraît démontré si l'on s'en tient aux nombreuses expériences de LÉPER et de ses collaborateurs.

Tout d'abord, LÉPER insiste sur la richesse de ces glandes en soufre. « Elles en renferment autant et même plus que le foie » dit-il [320] et il rapproche

ce fait de ce que BLANCHETIÈRE et BINET [298] ont noté au sujet du glutathion dont le taux dans la surrénale est supérieur à celui du foie. Rappelons aussi que LEMATTE, BOINOT et KAHANE [312] confirment les recherches de LÆPER en ce qui concerne la proportion de soufre dans la surrénale et dans le foie (il est vrai qu'il s'agit en l'espèce de foie de porc, et de surrénale de mouton). Mais les chiffres de LEMATTE et de ses collaborateurs montrent également que d'autres organes : hypophyse, rein, pancréas, renferment des proportions de soufre plus élevées que celles de la surrénale.

Cependant l'expérience apporterait la preuve que la surrénale, plus que les autres organes fixe le soufre. Bien plus, elle le fixerait quelle que soit sa forme. L'injection sous le péritoine du cobaye d'huile soufrée, d'albumines diverses, amènerait une augmentation du soufre surrénalien, moins grande d'ailleurs lorsqu'il s'agit d'huile soufrée que lorsqu'il s'agit d'albumines [324]. L'introduction de soufre peut même avoir lieu par voie cutanée. FOLDES, élève de LURIE [327] a noté que l'onction répétée à l'huile soufrée augmentait le volume des surrénales de lapin et leur contenu soufré. La même expérience répétée sur des rats blancs démontrait de façon très nette que de faibles quantités de soufre sont retenues par le foie, la rate, le rein, le muscle, tandis que de grandes quantités sont fixées par les surrénales.

Ces dosages comparatifs sur la glande elle-même mettraient en évidence son rôle thiopexique. Ce rôle paraît plus net encore, lorsque, ainsi que l'a fait

LÆPER [320] on examine le sang qui irrigue la surrénale : à la sortie le sang paraît moins riche en soufre qu'au moment où il pénètre dans la glande, et comme c'est surtout du soufre neutre qui a disparu, LÆPER conclut à la fixation de celui-ci. Que se passerait-il, si pour une raison quelconque la surrénale venait à abandonner sa fonction ? LÆPER a répondu à cette question par plusieurs expériences.

Chez l'animal décapsulé [322] la thiémie augmente, et fait intéressant, l'augmentation est formée principalement de soufre neutre, qui passe de 20 (taux normal) à 60 % du soufre total du sang, nouvel argument en faveur de la fixation de soufre neutre par la surrénale.

Chez l'addisonien [326] la thiémie est toujours plus élevée que chez l'individu normal. L'insuffisance fonctionnelle des capsules surrénales amène toujours une hyperthiémie. De plus le soufre du sang, lorsqu'il est en excès, se traduit par de la mélanodermie. Déjà la peau normale contient d'assez grandes quantités de soufre. Chez l'individu surrénalectomisé [321], elle devient le siège d'une accumulation de soufre, et, en cela elle n'est vraisemblablement pas seule, car HOUSSAY et MAZZOCCO [309] signalent une augmentation de glutathion dans le muscle après décapsulation.

D'après ces expériences LÆPER conclut à l'existence formelle d'une fonction thiopexique de la surrénale [323]. Il va même plus loin et indique la destinée du soufre fixé par la surrénale [320]. Une partie va être oxydée et éliminée par voie rénale. Une

autre est utilisée par les tissus et rentre dans la constitution de nouvelles molécules de protéines. Une autre enfin, sera directement utilisée par la surrénale pour fabriquer le pigment qui lui est propre et qui d'après LÆPER et ses collaborateurs [325] renferme 1 p. 1000 de soufre.

CHAPITRE II

RECHERCHES SUR LE SOUFRE DES CAPSULES SURRÉNALES

Nos recherches se sont bornées à l'étude du soufre total dans chacune des zones de la capsule surrénale.

Nous ne nous sommes pas occupé de la nature des substances soufrées, non plus que de leurs origines et de leurs destinées. Beaucoup plus modeste était notre but; et cependant cette étude, aussi limitée qu'elle soit, a demandé beaucoup de temps en raison des difficultés qui entourent le dosage du soufre total.

A. LES METHODES

Nos essais furent multiples et avant d'obtenir des chiffres se rapprochant de la réalité, nombreuses furent les expériences manquées. Nous donnons d'abord les méthodes de minéralisation et ensuite les méthodes de dosage proprement dit.

1. MINÉRALISATION PAR DES MÉLANGES ACIDES.

La minéralisation est sans conteste la partie la plus délicate du dosage. Elle doit être assez brève

pour ne pas amener d'erreur en excès (soufre du gaz), et cependant assez longue pour être complète (erreur par défaut). Aussi exige-t-elle des réactifs brutaux, d'autant que la prise d'essai est obligatoirement élevée (2 à 5 gr. de tissu frais selon que le dosage final sera volumétrique ou pondéral), car le taux de soufre est assez faible. L'emploi de méthodes micro-chimiques était rendu sinon inutilisable, du moins très difficile en raison de la délicate homogénéisation des prises d'essai; il eut fallu multiplier les dosages et prendre des moyennes.

D'abord, nous avons minéralisé par des mélanges acides : acides nitrique et perchlorique, acide nitrique et perhydrol, et devant l'insuffisance des premiers chiffres nous avons adopté la vieille méthode de LIEBIG, que nous avons prise comme témoin.

Nos dosages avec les mélanges acides ont été précédés de l'essai des réactifs. Fréquemment l'acide nitrique fumant contient de l'acide sulfurique. Plus souvent encore le perhydrol est stabilisé avec cet acide. Toutes nos recherches ont été effectuées avec des réactifs purs, en tous cas exempts d'acide sulfurique.

Les tâtonnements par lesquels nous avons passé avant d'arriver à une technique convenable ne trouvent pas place ici.

a) Par l'acide nitro-perchlorique.

Pour la technique aux acides nitro-perchlorique, le mélange minéralisant :

acide nitrique fumant 20 cc.

acide perchlorique pur 10 cc.

préconisé par LESURE et DUNEZ [314], après LEMATTE,

BOINOT et KAHANE [312], donne les meilleurs résultats. Il faut suffisamment d'acide perchlorique. Nos premiers essais nous donnaient des chiffres insuffisants parce que nous utilisions trop peu d'acide perchlorique. La minéralisation n'est d'ailleurs pas terminée lorsque le mélange est devenu incolore. Il faut continuer encore à chauffer en prenant des précautions, surtout au moment où l'évaporation se termine. Souvent le résidu noir, desséché et soumis à une haute température, fuse et l'expérience est perdue.

Voici pour résumer, la technique de minéralisation à l'acide nitroperchlorique, à laquelle nous avons abouti :

Deux grammes de tissu frais sont placés dans un bécher de 100 cc. en pyrex et additionnés de 20 cc. d'acide nitrique fumant et 10 cc. d'acide perchlorique à 60°. Le bécher recouvert d'un verre de montre est abandonné 4 heures. La substance s'est alors entièrement désagrégée, on chauffe doucement au bec bunsen, en prenant des précautions surtout à la fin de l'opération. Le résidu, encore noir, est repris par 5 cc. du mélange nitro-perchlorique qu'on évapore à nouveau à siccité. On laisse refroidir et chasse l'acide nitrique par addition de 2 cc. d'acide chlorhydrique qu'on évapore à sec. Le résidu est repris par 10 cc. d'eau distillée chaude qu'on transvase dans un ballon jaugé de 25 cc. Le bécher est rincé et les eaux de lavages versées dans le ballon. On complète à 25 cc. et on filtre. Une partie aliquote du filtrat est utilisée pour le dosage à la benzidine.

b) Par l'acide nitrique et le perhydrol.

En même temps qu'avaient lieu ces essais avec l'acide nitro-perchlorique, d'autres étaient effectués avec le mélange acide nitrique fumant et perhydrol. Là aussi nous nous sommes heurté à des difficultés avant d'arriver à la technique que nous donnons ci-dessous. Tandis qu'en micro-analyse, Mme POHORESKA-LELESZ [330] avec les mêmes agents de minéralisation et en quelques minutes obtient d'excellents résultats, lorsqu'on opère sur plusieurs grammes de tissu, il n'en va plus de même ou bien il faut employer d'assez grandes quantités de perhydrol.

Voici la technique de destruction à l'acide nitrique fumant et au perhydrol que nous avons finalement adoptée :

2 grammes de tissu sont traités dans un bécher en pyrex de 100 cc. par 20 cc. d'acide nitrique fumant et abandonnés 24 heures en vase couvert. Au bout de ce temps on ajoute 5 cc. de perhydrol et chauffe doucement quelques minutes; les vapeurs nitreuses, dont le bécher s'était empli pendant l'attaque à froid, et qui avaient disparu par l'addition de perhydrol, réapparaissent bientôt. On ajoute alors 2 cc. de perhydrol, continue à chauffer et recommence plusieurs fois cette opération. On évapore enfin à siccité, chasse l'acide nitrique par 2 cc. d'acide chlorhydrique et à nouveau chauffe à sec. Le résidu, refroidi un peu, est dissous dans 10 cc. d'eau chaude, qu'on transvase dans un ballon jaugé de 25 cc. On complète au trait avec les eaux de lavage du bécher, filtre et effectue le dosage sur une partie aliquote du filtrat.

Ces deux techniques se continuent par le dosage à la benzidine. Or les résultats de l'une et de l'autre, qui correspondent d'ailleurs assez bien entre eux, sont beaucoup plus élevés que ceux publiés par les auteurs. Cette erreur par excès pouvait provenir soit de la minéralisation, soit du dosage proprement dit qui utilise la benzidine. Or deux dosages, l'un pondéral, l'autre volumétrique, effectués sur une même solution provenant d'une minéralisation nitro-perchlorique nous ont donné des chiffres voisins. Ce n'est donc pas la méthode à la benzidine qu'il faut incriminer de cette erreur par excès, mais la minéralisation. Aussi, avons-nous essayé, à titre de comparaison, la méthode de LIEBIG qui nécessite l'emploi du dosage pondéral.

La méthode de LIEBIG-DU MÉNIL (d'après H. MEYER [328]) est une fusion alcaline oxydante. En quelques minutes (30 à 40) tout le soufre est passé à l'état de sulfate alcalin. Il suffit de reprendre par l'eau, de filtrer et d'opérer le dosage gravimétrique.

Comme nous considérons cette méthode comme la meilleure et la seule à utiliser lorsqu'on désire des résultats exacts, nous en donnerons plus loin la technique tout entière, de la minéralisation et du dosage proprement dit.

2. DOSAGE A LA BENZIDINE.

Nous avons vu que la minéralisation par des réactifs acides était régulièrement suivie du dosage à la benzidine.

La méthode volumétrique à la benzidine nécessite quelques précautions. Il faut employer de la benzidine recristallisée, en solution à 16 p. 1000 dans l'eau faiblement acidulée par l'acide chlorhydrique. Cette liqueur s'obtient en dissolvant au bain-marie 4 gr. de benzidine purifiée dans 210 cc. d'eau distillée, et 40 cc. d'acide chlorhydrique normal (ET. et PH. BARRAL [293]).

S'il reste de la benzidine non dissoute, ajouter de l'acide chlorhydrique normal, goutte à goutte, sans dépasser 5 cc. L'eau à utiliser tant pour cette solution que pour les lavages du précipité doit être de l'eau pure, sans traces d'oxydants (chlore).

De plus, la précipitation ne doit pas avoir lieu en milieu trop acide. La technique suivante inspirée de celle de BARRAL est suffisante pourvu qu'on évite la présence de nitrates, ou de chlorure de sodium, qui pour des raisons différentes enlèvent toute valeur au procédé.

Une partie aliquote du filtrat, la plus grande possible, est neutralisée en présence de phtaléine, puis ramenée à une réaction acide par addition d'une goutte d'acide chlorhydrique au 1/10^e. On verse ensuite en agitant 5 cc. de la solution de benzidine, et 5 cc. d'acétone pure. On laisse reposer 20 minutes et filtre sur Büchner. Le filtre est lavé successivement avec 5 cc. d'acétone et trois fois 5 cc. d'eau distillée froide. La dernière eau de lavage doit être neutre. Le filtre est placé dans le bécher avec 50 cc. d'eau distillée et III gouttes de phtaléine en solution alcoolique. On porte à l'ébullition, et on fait tomber goutte à goutte

d'une burette graduée au 1/20^e de cc., en maintenant l'ébullition, de la soude N/25, jusqu'à coloration rose persistant au moins une minute.

En multipliant le nombre de cc. de soude N/25 utilisé par le chiffre 0,00064, on a la quantité de soufre contenue dans la prise d'essai. Le soufre contenu par kilog de tissu frais est donné par la formule :

$$S \text{ } ^{0}/_{00} = \frac{n \times 0,00064 \times 1000}{p}$$

où p est le poids de la prise d'essai (ou plutôt le poids de tissu qui correspond au volume de solution employée).

3. NOUS RECOMMANDONS LA VIEILLE MÉTHODE DE LIEBIG (FUSION ALCALINE ET DOSAGE GRAVIMÉTRIQUE)

Nous avons vu précédemment pour quelles raisons nous préférons à ces techniques celle de LIEBIG-DU MÉNIL, obligatoirement suivie du dosage gravimétrique. Voici maintenant cette technique telle que nous l'avons appliquée :

Dans un creuset d'argent de 250 cc. environ on introduit 8 gr. de potasse caustique, 1 gr. de nitrate d'ammoniaque et 1 cc. d'eau et porte à une douce chaleur, par exemple en interposant, entre la flamme du bunsen et le creuset, une toile d'amiante. Lorsque les produits sont fondus on laisse un peu refroidir et introduit la prise d'essai (4 à 5 gr.). On chauffe d'abord doucement, puis graduellement plus fort. La masse brune se boursoufle, puis devient noirâtre. La croûte superficielle disparaît peu à peu; la masse se

fluidifie et brusquement apparaît incolore et limpide. Si, au moment de la fusion, quelques particules noires demeuraient dans le liquide, il faudrait laisser refroidir et ajouter quelques cristaux de nitrate d'ammoniaque. Chauffer à nouveau.

Pendant le refroidissement, le liquide incolore se prend en une masse solide, que l'on recouvre d'eau distillée. En s'aidant d'une douce chaleur, la masse se dissout très facilement. On transvase dans un ballon de 110 cc. jaugé, filtre, et sur 100 cc. du filtrat opère la précipitation par le chlorure de baryum.

Les 100 cc. du filtrat sont placés dans un bécher de 250 cc. et additionnés d'acide chlorhydrique jusqu'à non effervescence. Chauffer doucement jusqu'à l'ébullition. S'assurer que la réaction est acide. Verser goutte à goutte dans le liquide 10 cc. d'une solution de chlorure de baryum à 5 %. Continuer l'ébullition pendant 10 minutes. Recouvrir le bécher d'un verre de montre et laisser au repos 24 heures. Filtrer alors sur un filtre sans cendres et laver le bécher et le filtre avec de l'eau acidulée par l'acide nitrique. Continuer le lavage à l'eau distillée, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne trouble plus par addition de nitrate d'argent.

Sécher à 110°. Incinérer séparément le filtre et son contenu dans une capsule de platine tarée, calciner, laisser refroidir, peser.

Si p' est le poids du précipité, p , celui de la prise d'essai, le soufre contenu par kilog de tissu est donné par la formule :

$$S \ 0/00 = \frac{p' \times 32 \times 1000}{233 \times p} \times \frac{11}{10} = \frac{p' \times 0,1373 \times 11}{10 p}$$

On comprend aisément que la prise d'essai doit être importante (4 à 5 gr.) si l'on veut diminuer les causes d'erreur inhérentes à la pesée (30 à 70 mmgr.).

B. RESULTATS

Les chiffres de nos premiers essais volumétriques, obtenus après une minéralisation imparfaite ont été volontairement laissés de côté.

Le tableau ci-dessous groupe *tous* les résultats que nous ont donnés les techniques précisées plus haut : minéralisation nitro-perchlorique, ou par l'acide nitrique et le perhydrol ou par fusion alcaline oxydante.

Lorsque deux dosages comparatifs ont été effectués (deux prises d'essais du même tissu étant minéralisées à part) les chiffres sont réunis par une accolade.

Les résultats sont exprimés en *soufre par kilog. de tissu frais*. On peut les traduire en SO^3 en les multipliant par la fraction $\frac{5}{2}$, en SO^4H^2 en les multipliant par 3,062.

*Répartition du soufre
dans les capsules surrénales de Mammifères.*

Animal.	Minéralisation	Soufre par kg. de tissu frais	
		Corticale	Médullaire
Mouton.	Ac. nitro-perchlorique.	1.9	1.72 1.80
		2.54	
	Ac. nitrique-perhydrol.	2.58	2.32
		2.65	2.55
	Fusion alcaline.	2.30	1.86
Chèvre.	Ac. nitrique-perhydrol.	2.33	1.81
		2.53	
Bœuf.	Ac. nitro-perchlorique.		1.80
	Ac. nitrique-perhydrol.	2.96	2
	Fusion alcaline.	2.37	1.89
		2.21	1.40
Veau.	Ac. nitrique-perhydrol.	2.90	2.44
		3.18	2.20
	Fusion alcaline.	2.25	1.55
		1.95	1.46
Porc.	Ac. nitrique-perhydrol.	2.88	2.51
Cheval.	Fusion alcaline.	2.06	1.58
		2.06	

C. COMMENTAIRES

1°) Si l'on compare chez le **même animal** les résultats que donnent les **trois techniques** de minéralisation

que nous avons utilisées, on constate que les chiffres sont assez éloignés les uns des autres. Le mélange acide nitrique-perhydrol donne les plus élevés; la fusion alcaline, les plus faibles.

2°) Quelle que soit la méthode, un fait est constant; chez tous les Mammifères étudiés, la **cortico-surrénale est plus riche en soufre que la médullaire**. Tantôt la différence est minime (porc), tantôt elle paraît atteindre de notables proportions (bœuf). Voilà un fait qui correspond tant aux données de LÆPER [319] qu'à celles de LÉON BINET et GIROUD [295].

3°) Chez les animaux sains que nous avons étudiés, il semble bien que le taux de soufre soit **constant** dans chacun des tissus surrénaux. Les chiffres du LIEBIG varient de 1.95 à 2.37 pour la corticale, de 1.40 à 1.89 pour la médullaire. En rapportant ces chiffres à la glande totale, où la médullaire entre pour 1/4 du poids environ, le chiffre de soufre par kilog. de glande fraîche serait de 2.19, chiffre très supérieur à ceux de LÆPER et à celui de LEMATTE.

En présence de ces données précises, **peut-on parler de « fonction thiopexique » de la surrénale ?** Il est possible que la surrénale fixe du soufre, mais dans quelles proportions ? Même pour la corticale, où le taux de soufre est le plus élevé, ce taux apprécié d'une façon absolue et rapporté à la glande est particulièrement faible. LÆPER parle de soufre fixé, comme si la surrénale devenait un réservoir de soufre : or la surrénale de mouton, par exemple, qui pèse 1 gr. renferme environ 0,002 de soufre. Que sont

les 4 mgr. de soufre contenus dans les surrénales de mouton à côté des dizaines de grammes du soufre des muscles. Car LEMATTE nous apprend [312] que des tissus autres que les tissus surrénaux sont riches en soufre et notamment le foie, le muscle, etc...

D'autres endocrines (parmi lesquelles l'hypophyse, la thyroïde et le pancréas) peuvent en contenir plus que la surrénale.

Cependant, si l'on se reporte aux chiffres de BLANCHETIÈRE et BINET [298] qui classent la surrénale comme la glande la plus riche en glutathion, on peut supposer que le soufre surrénalien est en majeure partie actif et que les phénomènes d'oxydo-réduction sont intenses dans les deux parties de la glande surrénale. Peut être encore corticale et médullaire possèdent-elles une teneur voisine en soufre inactif et ne diffèrent-elles que par leur teneur en soufre actif, c'est-à-dire en glutathion.

L'AZOTE DANS LES CAPSULES SURRENALES DE MAMMIFERES

I. — LA QUESTION D'AZOTE SURRENAL A ÉTÉ PEU ÉTUDIÉE.

Les recherches antérieures sur la teneur des tissus surrénaux en azote sont réduites. LOEPER [323] parle de la teneur en « albumine » différente selon la zone surrénale, et fait de cette différence un argument pour localiser les produits soufrés dans la corticale. Mais LOEPER ne donne pas d'une façon précise les chiffres d'albumine ou d'azote total rapportés à la surrénale.

Seuls ceux qui se sont occupés de produits opothérapiques ont établi le taux d'azote de cette glande.

LEMATTE, BOINOT et KAHANE [312] donnent pour la glande totale de mouton le chiffre de 21,19 par kilog. de glande fraîche . Comparée à d'autres endocrines la surrénale contient généralement moins d'azote, comme il ressort du tableau suivant :

Azote par kg. de tissu frais	Vache	Mouton			Porc		
	ovaire	hypoph	C. S.	thyroïde	foie	pancréas	rate
	17.7	28.6	21.19	31.36	31.9	31.3	27.4

II. — NOUS AVONS EFFECTUÉ LE DOSAGE DE L'AZOTE SURRENAL PAR LE PROCÉDÉ DE KJELDAHL-RONCHÈSE.

Nous avons à notre tour dosé l'azote non plus sur la glande totale, mais séparément dans les deux tissus surrenaux.

Ce dosage a été effectué par une méthode classique, minéralisation par le procédé de KJELDAHL; c'est-à-dire transformation de l'azote en ammoniacque par l'acide sulfurique concentré et bouillant en présence d'un adjuvant, le sulfate de cuivre (modification de SISLEY) [333], et dosage de l'ammoniacque par formol-titration selon la méthode de RONCHÈSE.

a) 0 gr 50 à 1 gr. de tissu frais provenant d'un lot rendu aussi homogène que possible est introduit dans un petit matras de Kjeldahl en pyrex et additionné de 10 cc d'acide sulfurique concentré et pur, 10 gr. de sulfate de potassium (qui élève le point d'ébullition de l'acide), 0 gr. 50 de sulfate de cuivre anhydre pulvérisé, enfin une bille de verre. Le matras, placé dans une position inclinée, est d'abord chauffé doucement. L'eau s'évapore. Le liquide noir mousse un peu. Lorsque des vapeurs blanches apparaissent, on place sur l'ouverture du ballon un entonnoir à douille longue et dont l'extrémité est taillée en biseau. L'ébullition se poursuit tranquille. Lorsque le liquide est devenu bleuâtre, on prolonge l'opération encore dix à quinze minutes. A ce moment, le liquide est incolore et limpide.

La minéralisation demande 1 h 30 à 2 heures, rarement davantage. On laisse refroidir, dilue avec un peu

d'eau distillée, transvase dans un ballon jaugé de 100 cc que l'on complète au trait avec les eaux de lavage du matras. En retournant plusieurs fois le ballon jaugé, on mélange soigneusement les liquides.

b) Pour doser l'ammoniaque on prend 20 cc de cette solution et après dilution on neutralise en présence de phtaléine, d'abord avec de la soude au quart, puis lorsqu'on approche du virage, avec de la soude très étendue. On ajoute alors 10 cc de formol au demi neutralisé, et après agitation on fait tomber de la soude N/25 d'une burette graduée au 1/20 de cc.

Cette dernière opération, dosage de l'ammoniaque par formoltitration, est recommencée deux fois sur le liquide restant; les résultats doivent être voisins à deux gouttes près.

Chaque cc de soude N/25 correspond (en tenant compte du virage retardé de la phtaléine) à 0,000578 d'azote.

Pour rapporter cet azote à un kilog. de tissu frais, nous avons employé la formule

$$\text{Azote 0/00} = \frac{n \times 0,000578 \times 1000 \times 5}{p}$$

dans laquelle n est le nombre de cc de soude N/25 utilisés et p le poids de la prise d'essai.

III. — RÉSULTATS

Comme nous avons opéré sur des glandes non délipoidées, il fallait s'attendre à ce que nos chiffres, tant pour la médullaire que pour la corticale, offrent des différences d'espèce à espèce, mais restent, chez le même animal, assez voisins pour les deux parties de

la glande. C'est ce que l'on pourra à peu près constater dans le tableau suivant qui groupe nos résultats. Fréquemment on a fait sur un même lot plusieurs minéralisations : les résultats sont alors réunis par une accolade.

*Répartition de l'azote
dans les capsules surrénales de Mammifères.*

Azote par kilog. de glande fraîche.				
Animal	Corticale		Médullaire	
	Moyenne		Moyenne	
Mouton	29.9		26.02	
	30.2		28.84	
	25.2	27.81	26.7	27.05
	{ 27.88		{ 27.4	
	{ 26.30		{ 26.3	
	{ 27.4			
Chèvre	26.4		{ 23.09	
	{ 27.2	26.8	{ 23.02	23.04
Bœuf	{ 28.24		{ 25.54	
	{ 27.2	27.7	{ 25.2	25.37
Veau	34.57		30.01	
s. dte	31.1	32.9	27.7	28.6
s. gche	33.2		28.3	
Porc	{ 27.9		{ 29.1	
	{ 28.3		{ 26.8	
		29.05		28.8
	{ 30.5		{ 29.8	
	{ 29.5		{ 29.8	
Cheval	{ 33.3		{ 33.4	
	{ 33.9		{ 33.4	
	29.3	30.9	31.1	31.7
	27.3		28.8	

LEMATTE et ses collaborateurs [312] pensent que le rapport $\frac{\text{azote}}{\text{soufre}}$ peut caractériser un tissu. C'est en effet un indice de matière protéique, qu'il nous a paru intéressant d'établir pour distinguer les deux zones surrénales. Les chiffres de soufre utilisés sont ceux donnés par la méthode de LIEBIG et ceux d'azote sont les moyennes.

Animal		Corticale		Médullaire	
		Rapport	$\frac{\text{Azote}}{\text{Soufre}}$	Rapport	$\frac{\text{Azote}}{\text{Soufre}}$
Mouton	N	27.81	12	27.05	14
	S	2.30		1.86	
Bœuf	N	27.7	12.1	25.37	15.4
	S	2.29		1.64	
Veau	N	32.9	15.6	28.6	19
	S	2.10		1.50	
Cheval	N	30.9	15	31.7	20
	S	2.06		1.58	

IV. — COMMENTAIRES.

1°) Les chiffres d'azote total provenant de l'application de la technique précédemment décrite à un même échantillon de tissu offrent une assez grande concordance. Il semble bien que les variations enregistrées dans une même espèce soient individuelles.

Elles sont d'ailleurs assez faibles, et ne dépassent qu'exceptionnellement 15 % chez le mouton.

2°) Fait à peu près constant : **corticale** et **médullaire** ont une teneur en azote très voisine. Chez tous les Mammifères étudiés sauf chez le cheval, la corticale est légèrement plus riche en azote, mais la différence est trop minime pour acquérir une valeur démonstrative.

3°) **D'espèce à espèce**, les chiffres d'azote de chacun des tissus ont des variations de plus large amplitude : c'est ainsi qu'elles s'étendent pour la corticale de 27.7 (bœuf) à 32.9 (veau) et pour la médullaire de 23.04 (chèvre) à 31.7 (cheval).

4°) Quant à l'indice $\frac{\text{soufre}}{\text{azote}}$ il était facile de le prévoir plus élevé dans la médullaire, puisqu'on connaissait la presque égalité de l'azote dans les deux zones, et l'inégalité de soufre au profit de la corticale. Cependant, il est intéressant de noter un coefficient qui situe les deux zones, c'est le rapport $\frac{\frac{N}{S} \text{ corticale}}{\frac{N}{S} \text{ médullaire}}$ qui est sensiblement $\frac{4}{5}$ chez les quatre animaux étudiés.

LE POTASSIUM DANS LES CAPSULES SURRENALES DE MAMMIFERES

I. LA QUESTION DE LA RÉPARTITION DU POTASSIUM DANS LA GLANDE SURRÉNALE EST PEU CONNUE.

Peu d'auteurs se sont occupés de cette question. Et ceci en raison du petit nombre de méthodes susceptibles d'être appliquées à de minimes quantités de tissu et de fournir des résultats comparables entre eux. LEMATTE, BOINOT et KAHANE [312] ont dosé le potassium des capsules surrénales du mouton en même temps que d'autres éléments minéraux et ont trouvé, évalué en KOH, 4,208 gr. par kilog. de glandes fraîches. Le dosage après minéralisation sulfo-perchlorique était effectué sous forme de cobaltinitrite, d'après la technique de GAROLA et BRAUN [303]. Comparé à celui des autres endocrines, ce chiffre est intermédiaire. Certaines, comme le pancréas, la rate, sont plus riches (5 à 6 gr. de KOH) d'autres, comme l'ovaire, le sont beaucoup moins; BAUMANN et S. KURLAND [294] au cours de recherches sur les substances minérales du sang des animaux surrénalectomisés, ont noté une augmentation du potassium du plasma. Cela donnerait à penser que la surrénale joue quelque rôle dans la distribution du potassium de l'organisme.

Trouvant dans le procédé de LEULIER, VELLUZ et GRIFFON [316], dont on trouvera la mise au point dans la thèse de GRIFFON [304] un moyen de travail approprié, nous avons étudié la répartition du potassium dans les capsules surrénales de Mammifères.

II. LA MICROMÉTHODE DE LEULIER, VELLUZ ET GRIFFON PERMET DE DOSER LE POTASSIUM AVEC PRÉCISION.

La méthode de LEULIER, VELLUZ et GRIFFON précipite, après minéralisation sulfo-perchlorique, le potassium sous forme de cobalti-nitrite mixte de potassium et de sodium, et après hydrolyse, et oxydation de l'acide nitreux par le permanganate à froid, détermine par iodométrie l'excès de ce réactif oxydant. Elle permet le dosage en série de quantités de potassium variant de 0 mmgr. 1 à 5 mmgr. par prise d'essai.

1) La *minéralisation* [317] s'effectue au moyen du mélange de LEMATTE [312]

acide sulfurique pur	3.5
acide perchlorique pur	6.5

On place dans un tube à centrifuger en pyrex, très propre, 0 gr. 15 à 0 gr. 20 de tissu frais et ajoute 1 cc. du mélange sulfo-perchlorique. Le tube incliné, disposé sur une toile d'amiante, est chauffé sous une hotte à la lampe à alcool, ou à la veilleuse de bunsen. L'opération dure environ une heure. Elle est terminée lorsque la substance est dissoute et le liquide incolore. On laisse alors refroidir, et l'on ajoute 2 cc. d'eau distillée et par petites portions du carbonate de

lithium pour *neutraliser*. L'excès de carbonate est décomposé par l'addition de quelques gouttes d'acide acétique. A ce moment, on introduit 2 cc. de nitrite de soude à 20 %, puis un demi cc. d'acide acétique cristallisable, porte 30 minutes au bain-marie bouillant et laisse refroidir.

2) On verse alors dans le tube, qui contient environ 5 cc. de liquide, 1 cc. de réactif *précipitant*, renfermant 0 gr. 25 de cobaltinitrite de sodium et acidulé par l'acide acétique : la concentration du réactif doit être obligatoirement de 5 % du volume final. On mélange soigneusement par agitation et laisse reposer 30 minutes en maintenant le tube rigoureusement vertical pour éviter toute précipitation partielle sur les parois.

On centrifuge 5 minutes à grande vitesse et décante aux 2/3, et après addition de 5 cc. d'eau distillée, on agite, centrifuge à nouveau et décante complètement en renversant le tube : la précipitation ayant eu lieu dans un milieu très dense, il faut diminuer cette densité pour pouvoir décanter complètement sans risquer des pertes. Le précipité est ensuite *lavé* : 3 fois avec le mélange

alcool à 95°	12 cc.
éther	12 cc.
acide acétique glacial	4 cc.
eau distillée	6 cc.,

une fois à l'alcool-éther, et une fois à l'éther. Chaque lavage est suivi de centrifugation et de décantation.

Le précipité, lorsque l'éther est évaporé, est soumis à une *hydrolyse* en présence de 10 cc. d'une solution

de phosphate de soude à 5 %. A l'aide d'un agitateur, le précipité est mis en suspension et placé au bain-marie, pendant 5 minutes. L'hydrolyse a lieu, le précipité jaune a cédé la place à un louche brunâtre de phosphate de cobalt.

On mesure dans un bécher 20 cc. de solution *oxydante* de permanganate de potassium environ N/100 et 1 cc. d'acide sulfurique, et l'on transvase dans le bécher le contenu du tube et ses eaux de lavage. On agite et attend 30 minutes. L'oxydation est alors complète. On ajoute 3 cc. d'iodure de potassium à 10 %. *L'iode libéré* est titré par l'hyposulfite de sodium centi-normal à l'aide d'une burette graduée au 1/20 de cc.

La solution de permanganate utilisée est titrée dans les mêmes conditions. Soit n le nombre de cc. d'hyposulfite trouvés pour le témoin, n' le nombre observé pour la solution de cobalti-nitrite, p la prise d'essai, la teneur en potassium par kilog. de tissu frais est donnée par

$$\text{potassium } ^{0}/_{00} = \frac{(n - n') 0,065 \times 1000}{p}$$

III. RÉSULTATS.

Les résultats qui sont groupés dans le tableau suivant sont exprimés en grammes de potassium métal par kilog de tissu frais. Tous les dosages ont été effectués en double (1).

(1) Nous adressons ici nos remerciements sincères à Mlle A. BERNARD, licenciée ès sciences, chimiste du laboratoire de Desgenettes, pour l'aide aimable qu'elle nous a particulièrement apportée dans cette partie de notre travail.

*Répartition du potassium
dans les capsules surrénales des Mammifères.*

Animal	Potassium par kilog de tissu frais.	
	Corticale	Médullaire
Mouton	3.81	3.73
	4.64	3.74
	4.54	3.90
	4.52	4.20
	3.85	3.41
		3.26
Bœuf	3.89	3.33
	3.85	3.43
	4.33	3.21
	4.10	3.74
Veau	4.52	3.52
	4.84	3.74
Porc	4.94	4
	4.25	3.62
Cheval	4.24	4.18
	4.27	3.97

IV. COMMENTAIRES.

1) Ces chiffres comparatifs outre qu'ils démontrent une fois de plus la sécurité de la méthode, nous indiquent la répartition **à peu près égale** du potassium non seulement dans les deux zones de la surrénale mais encore dans les capsules d'animaux d'espèces différentes.

En effet, le potassium de la corticale varie, chiffres extrêmes, de 3,81 à 4,94 et le potassium de la médullaire de 3,21 à 4,20. Ces chiffres extrêmes font ressortir la richesse très légèrement supérieure de la corticale, comme aussi en témoignent les moyennes, (corticale 4,30, médullaire 3,68).

2) Comparés aux chiffres de LEMATTE [312] qui donne ses résultats en KOH et pour la glande totale, nos résultats atteignent des teneurs en potassium nettement plus élevées. Mais ceci n'est pas une exception : nous avons fait la même remarque au sujet du phosphore, du soufre et de l'azote.

CINQUIÈME PARTIE

VUE D'ENSEMBLE DU TRAVAIL

Après avoir exposé nos méthodes et nos résultats, la seule tâche qui nous reste est, semble-t-il, d'en déduire les quelques conclusions logiques qui en découlent. Cependant, il nous apparaît impossible en quelques phrases brèves de faire ressortir les certitudes et les probabilités que nous apportons en solution aux problèmes envisagés dans les pages liminaires de ce travail. Et au surplus, nous ne pouvons répondre à toutes les questions posées et il nous reste des points obscurs au sujet desquels nous sommes conduit à adopter la forme interrogative. Aussi, nous pensons utile de synthétiser en ces commentaires les discussions partielles que l'on trouve à la fin des chapitres où sont classées nos recherches.

*

* *

Si nous envisageons l'**adrénalinogénèse**, il apparaît tout d'abord que le rôle de la corticale semble au moins très incertain pour ne pas dire nul dans la formation de l'hormone surrénalienne. Sans doute, les méthodes physiologiques sont pleines de contradictions, la méthode chimique elle-même n'est peut-être pas totalement probante; mais tout s'éclaire si l'on songe aux difficultés des dissections, aux sensibilités des réactions et à la facile diffusion de l'adré-

naline dans les couches de la corticale qui sont au contact immédiat de la médullaire. Le fait le plus probant est l'absence de nouvelle formation d'hormone après la mort alors que dans certaines conditions la médullaire en libère des quantités souvent très appréciables.

En tous cas, le rôle corticalien ne serait pas de règle dans toute la série animale, quelle explication donner en effet pour les animaux dont les deux organes sont totalement séparés et indépendants ?

Tous ces faits ont une valeur telle qu'ils ne peuvent être considérés comme des objections mais comme des preuves. La médullo-surrénale des Mammifères élabore donc l'adrénaline de façon élective et exclusive aux dépens d'une substance totalement inconnue et qu'on a essayé de rattacher à des corps chimiques connus. A ce sujet on peut répéter ici ce que signale POLONOWSKI [117] à propos de l'origine de l'hordénine et de sa parenté avec la tyrosine. « En effet, dit-il, de ce que l'hordénine possède une formule voisine de la tyrosine, nous ne sommes pas encore autorisés ipso facto à déduire que notre alcaloïde dérive de cet acide aminé. Ces deux composés pouvaient fort bien provenir d'une formation parallèle et être l'un et l'autre le résultat d'une synthèse primitive de la plante ou encore l'un et l'autre des produits du métabolisme des protides ».

Sous quelle forme cette adrénaline d'une puissance physiologique rare se trouve-t-elle dans le parenchyme médullaire ? A l'état libre ? A l'état combiné ? Nos recherches font pencher pour la seconde hypo-

thèse car il y a une libération d'hormone dans le vide profond et sec, et cette même hormone réagit alors avec une grande vitesse sur ses réactifs caractéristiques. La nature de la combinaison reste cependant à déterminer et ce n'est qu'une probabilité de la considérer comme se faisant aux dépens des protides qui « virtualiseraient » ainsi l'adrénaline.

Mais à ce propos, un conflit s'élève entre les méthodes chimiques et les méthodes physiologiques. Les réactions positives des premières s'avèrent égales ou négatives pour les secondes. Est-ce véritablement un conflit insoluble ? Est-ce que les conditions expérimentales sont les mêmes ? Nous ne pouvons que faire appel ici à des recherches étrangères aux nôtres. Mais il semble bien acquis que le *dosage d'une activité pharmacodynamique est totalement différent du dosage chimique d'une substance déterminée*. L'animal réagit d'une façon inégale, et il est évident qu'une élévation de pression est une résultante influençable par des substances antagonistes. Dans le dosage chimique, on essaie de caractériser étroitement un corps défini et d'écarter au maximum tous les autres.

Si trop de techniques chimiques revêtent un aspect d'exactitude grâce aux protocoles des manipulations qui restent correctes, il ne faut pas oublier que beaucoup ont un point de départ rempli d'incertitudes et de causes d'erreurs multiples. Aussi, avons-nous multiplié les précautions et avons-nous essayé de rendre étroitement spécifique et rigoureuse la méthode que nous avons employée. Quant aux méthodes physiolo-

giques, nous le répétons, elles sont incomparables pour déterminer le sens et l'intensité des réactions physiologiques, mais elles comportent trop d'inconnues pour égaler la rigueur d'un dosage chimique vrai.

A notre avis, il n'y a pas un antagonisme irréductible entre les deux méthodes, car elles ne sont pas superposables du moins dans le cas particulier. Chimiquement il existe une adrénaline masquée à ses réactifs, que l'on ne saisit pas, par voie physiologique (1). Il y a une « cryptadrénaline » chimique, dont l'isolement serait une démonstration irréfutable, mais nos recherches ne nous permettent que d'en constater l'existence sans en pouvoir donner la constitution.

A côté de ces considérations en partie théoriques, nous avons établi l'extrême variabilité des teneurs adrénaliniennes des médullo-surrénales, non seulement d'espèce à espèce, mais encore d'individu à individu; les variations chez les animaux sains rendent très difficile l'étude des variations pathologiques lorsque *le taux d'hormone reste dans la limite des chiffres extrêmes*. Ceux-ci offrent une telle marge qu'il est impossible de tenir compte d'autre chose que des chiffres inférieurs aux plus faibles. D'autre part est-il entièrement logique d'établir avec les moyennes des rapports entre la taille, le poids et la teneur en adrénaline ? Il ne peut s'agir là que d'approximations utiles sans doute, mais dont l'utilité ne doit pas masquer la précarité.

(1) Les travaux récents de PAGET et LEBLOND [113*] semblent cependant démontrer un certain parallélisme entre les deux méthodes.

*

* *

Comme on a pu s'en rendre compte, la question des **lipides** surrénaliens a suscité un nombre considérable de recherches et il est bien vraisemblable que nous ne les avons pas toutes mentionnées.

Les pourcentages élevés de cholestérol notés soit dans les capsules humaines, soit dans celles d'autres animaux comme le cobaye, le chat, etc. ont tout naturellement été le point de départ de théories plus ou moins hasardées. Et c'est ainsi que la cholestérolémie est apparue sous la dépendance de la réserve cholestérolique de la surrénale. Outre que ce réservoir est d'une bien faible importance en soi, il est assez curieux de voir les Ruminants qui transportent dans leur sang une quantité considérable de cholestérol en posséder normalement dans leurs surrénales des quantités qui seraient considérées, chez l'homme, en particulier, comme pathologiques. Nous n'insistons pas sur les arguments que l'on peut tirer des recherches d'autres auteurs et nous versions ce nouveau fait à un débat qui paraît évoluer vers l'attribution d'un rôle moins prépondérant aux glandes surrénales.

De plus, si l'on veut bien se souvenir des chiffres de cholestérol *libre* surrénalien noté chez les divers animaux étudiés par nous, on arrive à cette conclusion que c'est un élément d'une fixité étonnante. Il constitue une véritable constante qu'il s'agisse de la médullaire ou de la corticale, et cette fixité s'oppose tout naturellement à la variabilité du cholestérol éthérifié dans les différentes espèces. Et il n'y a pas

lieu évidemment, d'interpréter les différences notées par l'apport alimentaire, puisque la différence n'est pas grande entre le régime alimentaire du bœuf et celui du cheval qui constituent les deux exemples les plus frappants. Nos recherches démontrent que la teneur cholestérolique des surrénales est faite d'une petite partie libre constante, et qu'au delà elle est conditionnée par un élément extraordinairement variable, formé d'éthers cholestéroliques divers. Est-ce que ce fait ne plaide pas plutôt en faveur d'un rôle cholestéropexique banal, plutôt qu'en faveur d'un rôle cholestérogène ? Il nous semble que c'est un argument qui possède quelque valeur car on ne s'expliquerait point le rôle synthétique réduit des surrénales du bœuf comparé au rôle apparemment très actif des surrénales du cheval. Et pourquoi éthérifier le cholestérol après synthèse ?

Les essais de *localisation* du cholestérol nous ont permis de faire des constatations curieuses et qui n'avaient pas encore été signalées avec le développement que nous leur donnons. Ici l'histo-chimie et la chimie donnent des résultats qui sans être opposés ne s'accordent point. Par les méthodes physiques ou par les réactions colorées l'histo-chimie détecte les lipides cholestéroliques dans la corticale et uniquement dans cette zone qui apparaît ainsi comme douée d'une fonction élective. Et c'est pourquoi tous les auteurs insistent sur le rôle lipidogène de la cortico-surrénale.

Et à ce propos, il nous sera permis d'insister sur le manque de spécificité de beaucoup de réactions histo-chimiques et sur la brutalité d'action des réactions

spécifiques. C'est pourquoi nous avons essayé l'action de certaines saponines, mais nos résultats plus précis que ceux donnés par d'autres méthodes, nous ont amené à des conclusions analogues. Le complexe cholestérol-saponine ne se forme et ne se révèle que dans les couches corticales.

Cependant si on pousse plus avant par les méthodes chimiques l'étude de la composition de la zone médullaire, on voit que toutes les formes du cholestérol cortical s'y retrouvent dans des proportions importantes. Et cette constatation n'est pas sans diminuer le rôle de la corticale déjà amoindri par ce que nous avons dit précédemment.

De plus, si en laissant de côté le rôle physiologique de la surrénale dans le cycle du cholestérol, on examine seulement le côté expérimental pur, on ne peut manquer d'être frappé de la *discordance des résultats histologiques et chimiques*. On est alors amené tout naturellement à se poser la question suivante : pourquoi le cholestérol médullaire est-il indécélable par les techniques histochimiques ? Pourquoi les éthers cholestéroliques ont-ils perdu toute leur biréfringence ? Nous aurions voulu isoler le complexe qui les dissimule et arriver à des résultats analogues à ceux qui ont été obtenus récemment pour les lipides sanguins. Nos efforts n'ont pu aboutir et nous ne pouvons que formuler l'hypothèse d'une combinaison différente et spéciale à la médullaire. Peut être les lipides cholestéroliques sont-ils sous forme d'une combinaison protidique qui masque leurs propriétés essentielles, com-

binaison qui peut se rapprocher de celle que l'on rencontre dans le sérum sanguin.

En dehors des lipides cholestéroliques et des lipides tels que les graisses, la surrénale renferme des *lipides phosphorés*. La répartition de ces substances, dont le type le plus connu est la lécithine du jaune d'œuf, apparaît semblable à celle du cholestérol et les deux zones en renferment des quantités sinon égales, du moins très voisines. La fixité du phosphore lipidique d'une part, et celle du cholestérol libre d'autre part, permettent d'établir pour les zones surrénaliennes un rapport qui les caractérise et distingue ces zones dans une espèce donnée. Ce rapport a l'avantage de ne pas être influencé par des éléments tels que les éthers cholestéroliques dont la variabilité lui enlèverait toute valeur.

*

* *

Après avoir considéré les éléments qui sont les témoins des grandes fonctions attribuées par la plupart des auteurs aux glandes surrénales, il nous reste à parler de leur intervention dans le métabolisme du **soufre**. La thiémie a été mise comme la cholestérolémie sous la dépendance sinon totale, du moins partielle des capsules surrénales. Les arguments invoqués ne nous paraissent pas entraîner une conviction ferme. La réserve surrénalienne de soufre sous ses diverses formes apparaît très petite en regard du soufre accumulé dans les masses musculaires. D'autre part, le septicisme s'accroît lorsque l'on considère l'incertitude des chiffres de base. Des chiffres intéressants

ont été cependant fournis en ce qui concerne le soufre organique et plus spécialement le soufre peptidique qui rentre dans le groupe des corps dont le glutathion est le type le mieux connu.

Sans vouloir entrer dans des considérations théoriques, nous avons étudié la répartition du soufre total dans les deux parties de la surrénale et avons noté des chiffres un peu plus élevés en faveur de la zone corticale. Mais ces chiffres démontrent que la réserve soufrée de la surrénale est infiniment petite et que les quelques milligrammes de soufre que l'on y peut rencontrer sont une bien faible preuve du rôle thiopexique de cette glande endocrine.

*

* *

Parmi les autres principes déterminés par nous, l'azote et le potassium n'appellent point de commentaires spéciaux.

CONCLUSIONS

A) Méthodes.

1. — Nous avons précisé la méthode de détection histochimique du cholestérol libre dans les capsules surrénales du cobaye à l'aide de la digitonine et d'autres saponines.

2. — Nous avons étudié les facteurs qui peuvent influencer les méthodes de dosage colorimétrique de l'adrénaline et nous avons démontré l'imprécision de la méthode à l'iode. La technique de BAILLY, au sublimé, nous a paru, dans certaines conditions, offrir le maximum d'exactitude et de sécurité.

B) Résultats.

1. — On peut trouver dans la cortico-surrénale des traces ou des quantités assez notables d'adrénaline libre, mais on n'y rencontre pour ainsi dire jamais d'adrénaline virtuelle.

2. — La médullo-surrénale renferme des quantités importantes d'adrénaline libre et d'adrénaline virtuelle. Ces quantités sont variables non seulement d'espèce à espèce, mais d'individu à individu de la même espèce.

3. — Les surrénales renferment dans les deux zones des quantités notables et fixes de cholestérol *libre*. Les quantités d'éthers cholestéroliques se révèlent par contre très variables et peuvent être en très faible proportion (Ruminants).

4. — L'histo-chimie permet par divers artifices, lumière polarisée, coloration ou précipitation, de retrouver le cholestérol dans la corticale, alors qu'elle n'en détecte pas dans la médullaire. La méthode qui utilise la précipitation du cholestérol *libre* à l'état de complexe avec la digitonine apparaît plus spécifique, mais elle donne des résultats analogues aux anciennes méthodes histologiques.

5. — Le phosphore lipidique témoin de la présence des phosphatides se rencontre en quantités voisines dans les deux zones, cependant avec un léger excès en faveur de la corticale. On peut faire les mêmes constatations pour le phosphore total, mais cette fois la différence est en faveur de la médullaire.

6. — Les rapports $\frac{\text{P lipidique}}{\text{P total}}$ et $\frac{\text{cholestérol libre}}{\text{P lipidique}}$ sont d'une constance remarquablement étroite et caractérisent nettement les deux zones surrénales.

7. — Le soufre existe en quantités appréciables dans les deux parties de la glande. La zone corticale est toujours plus riche que la zone médullaire, mais parfois les différences sont très peu accentuées. En tous cas le rôle thiopexique de la glande apparaît peu important.

8. — Nous avons dosé le potassium et l'azote. Le premier se révèle en quantité voisine dans les deux zones des capsules des différentes espèces étudiées, tandis que pour le second les chiffres, voisins dans une espèce donnée, varient d'espèce à espèce.

BIBLIOGRAPHIE

L'étude biochimique des surrénales a fait l'objet d'un très grand nombre de mémoires. Dans cette liste déjà fort longue nous n'avons cité que ceux qui sont le plus directement en rapport avec notre étude. La plupart des références ont été consultées dans le texte même, sinon nous en avons toujours indiqué la source.

Abréviations utilisées pour les Revues fréquemment consultées :

- Bioch. J.* — Biochemical Journal.
Bioch. Zeitsch. — Biochemische Zeitschrift.
B. Hist. Appl. — Bulletin d'histologie appliquée.
B. S. P. — Bulletin des Sciences Pharmacologiques.
B. Soc. Ch. Biol. — Bulletin de la Société de Chimie Biologique.
Ch. Abstracts. — Chemical Abstracts.
C. R. — Comptes Rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences.
Endoc. — Endocrinology.
J. Biol. Ch. — Journal of Biological Chemistry.
J. P. C. — Journal de Pharmacie et de Chimie.
J. of P. — Journal of Physiology.
P. M. — Presse médicale.
S. B. — Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie.

Ces abréviations sont suivies de l'année, du tome (en lettres grasses) et de la page.

OUVRAGES D'ENSEMBLE

- [1] BARRAL ET. — Précis d'Analyse chimique biologique générale. — *Baillière, Paris* 1925.
- [2] BIEDL A. — Innere Sekretion. — 2 vol. *Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien*, 1913.
- [3] DA COSTA C. — L'appareil surrénal. — *P. M.* 8 sept. 1923.
- [4] DENIGÈS G. — Précis de chimie analytique. — *Maloine Paris* 1920.
- [5] FOURNEAU E. — Préparation des médicaments organiques. — *Baillière, Paris* 1921.
- [6] GARDNER and Fox. — A critical study of the methods of estimating cholesterol and its esters in tissues. — *Bioch. J.*, 1924-18-1058.
- [7] GAUTIER A. — Cours de Chimie. III. Ch. biologique. — *Paris* 1892.
- [8] GUIEYSSE. — La capsule surrénale du cobaye. — *Th. Méd., Paris* 1901.
- [9] HUGOUNENQ L. — Précis de Chimie Physiologique et Pathologique. — *Doin, Paris* 1925.
- [10] LAMBLING E. — Précis de biochimie. — *Masson, Paris* 1925.
- [11] LEULIER A. — Précis de Pharmacie Chimique. — *Maloine, Paris* 1929.
- [12] MOREL A. — Précis de technique chimique. — *Doin, Paris* 1907.
- [13] PETTIT A. — Recherches sur les surrénales. — *Th. Sc. Nat., Paris* 1896.
- [14] POIRIER. — Traité d'Anatomie, 1892-1904 — 7 vol., t. V : *glandes surrénales*.
- [15] POLICARD A. — Précis d'histologie physiologique. — *Doin, Paris* 1928.
- [16] RENAUT. — Traité d'histologie. 2 vol. — *Bataille, Paris* 1893-1899.
- [17] SCHAFER ED. SH. — Les glandes à sécrétion interne. Physiologie et physiopathologie des glandes endocrines, traduit et annoté par Guy LAROCHE et RICHARD. — *Doin, Paris* 1921.

- [18] SOULIÉ A. H. — Recherches sur le développement des capsules surrénales chez les vertébrés supérieurs. — *Th. Sc. Nat., Paris* 1903.
- [19] TOURNADE A. — Les capsules surrénales, dans tome IV (Sécrétions internes) du *Traité de physiologie normale et pathologique*. — *Masson, Paris* 1928.

ADRENALINE ET SURRENALES

- [20] ABELOUS J. E. et ARGAUD R. — Inversion réactionnelle de la substance corticale et de la substance médullaire dans les capsules surrénales abscédées. — *S. B.* 1929-102-893.
- [21] ABELOUS J. E. et ARGAUD R. — Le lieu de formation de l'adrénaline, substance médullaire ou substance corticale de la glande surrénale ? — *S. B.*, 1930-103-129.
- [22] ABELOUS J. E. et SOULA L. C. — Adrénaline active et adrénaline virtuelle. — *S. B.*, 1922-86-749.
- [23] ABELOUS J. E., SOULIÉ A. et TOUJAN G. — Dosage colorimétrique par l'iode de l'adrénaline. — *S. B.*, 1905-57-301.
- [24] ABELOUS J. E., SOULIÉ A. et TOUJAN G. — Sur l'identité d'action des extraits de substance corticale et médullaire des capsules surrénales. — *S. B.*, 1905-57-520.
- [25] ABELOUS J. E., SOULIÉ A. et TOUJAN G. — Sur la formation de l'adrénaline par les capsules surrénales. — *S. B.*, 1905-57-533.
- [26] ABELOUS J. E., SOULIÉ A. et TOUJAN G. — Sur l'origine de l'adrénaline. — *S. B.*, 1905-57-574.
- [27] ADDISON TH. — Communication at a meeting of the South London Medical Society, 6 march 1849. *London Med. Gazette* 8, 517 (d'après BARGER [33]).
- [28] ALDRICH. — A preliminary report on the active principle of the suprarenal glands. — *Am. J. Physiol.*, 1901-5-457.
- [29] ARNOLD R. et GLEY P. — Sur l'origine de l'adrénaline. — *S. B.*, 1925-92-1413.
- [30] BAGINSKI. — Détection histochimique de l'adrénaline. — *B. Hist. App.* 1928-5-129.
- [31] BAILLY. — Application de la réaction Denigès-Grim-

- bert-Leclère à la caractérisation et au dosage de l'adrénaline dans les poudres de surrénales. — *J. P. C.*, 1924-(7^e s.)-30-404.
- [32] BALFOUR. — A monograph on the development of Elasmobranch fishes. — *J. of Anat.* 1876, 1877, 1878 (d'après SOULIÉ [18]).
- [33] BARGER G. — The simpler natural bases. — *London* 1914. (Collection *Monographs on biochemistry*, Longmans, Green and Co éd.).
- [34] BATTELLI F. — Dosage colorimétrique de la substance active des capsules surrénales. — *S. B.*, 1902-54-571.
- [35] BATTELLI F. — Quantité de substance active contenue dans les capsules surrénales de différentes espèces animales. — *S. B.*, 1902-54-928.
- [36] BATTELLI F. — Quantité d'adrénaline existant dans les capsules surrénales de l'homme. — *S. B.*, 1902-54-1205.
- [37] BATTELLI F. — Transformation de l'adrénaline in vitro. Diminution de la toxicité en milieu alcalin. — *S. B.*, 1902-54-1435.
- [38] BATTELLI et BOATTA. — Influence de la fatigue sur la quantité d'adrénaline existant dans les capsules surrénales. — *S. B.*, 1902-54-1203.
- [39] BAYER G. — Methoden zur Verschärfung von Adrenalin- und Brenzcatechinreaktionen. — *Bioch. Zeitschr.*, 1909-20-178.
- [40] BOIVIN G. — Sur l'atténuation de la toxicité de l'adrénaline par quelques substances organiques. — *S. B.*, 1929-100-251.
- [41] BONNAMOUR S. — Etude histologique des phénomènes de sécrétions de la capsule surrénale chez les Mammifères. — *Th. Méd. Lyon* 1905.
- [42] BOULUD R. et FAYOL. — Dosage colorimétrique de l'adrénaline. — *S. B.*, 1903-55-358.
- [43] BRETEAU P. — Solution de novocaïne-adrénaline pour anesthésie locale. — *J. P. C.*, 1922-(7^e s.)-25-97.
- [44] BROWN-SÉQUARD. — Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales. — *C. R.*, 1856-43, pp. 422 et 542.
- [45] CANNON W. B. et de la PAZ D. — Emotional stimulation of adrenal secretion. — *Am. J. Physiol.*, 1911-28-64.
- [46] CEVIDALLI A. et LEONCINI F. — Recherches sur le mode de se comporter « post mortem » du principe ac-

- tif des capsules surrénales. — *Arch. ital. Biol.*, 1910-54-429.
- [47] CHALIER J., BROCHIER, CHAIX A. et GRANDMAISON. — Contribution à l'étude du rôle des reins et des surrénales dans la malignité diphthérique. — *J. Méd., Lyon* 1927-8-1.
- [48] CIACCIO C. — Sur la topographie de l'adrénaline. — *S. B.*, 1906-58-333.
- [49] CIACCIO C. — Sur la sécrétion de la couche médullaire de la capsule surrénale. — *S. B.*, 1906-58-332.
- [50] CODEX (rapport de la 14^e sous-commission (FABRE). — Produits opothérapiques. — *J. P. C.*, 1925-(8^e s.)-1-433.
- [51] COMESSATTI. — Nota di chimica clinica sulla reazione specifica dell'adrenalina e sue applicazioni. — *Biochim. e terap. sperim. Milano*, 1909-304.
- [52] DA COSTA C. — Le tissu paraganglionnaire. — *B. Hist. Appl.* 1926-3-10.
- [53] CRAMER. — A histochemical method for the demonstration of adrenalin granules in the suprarenal glands. — *Proc. Physiol. Soc.*, 26 jan. 1918, in *J. of P.*, 1918-52-VIII.
- [54] CUSHNY A. R. — The action of optical isomers. III Adrenalin. — *J. of P.*, 1908-37-130.
— Further note on adrenalin isomers. — *J. of P.*, 1909-38-259.
- [54*] CYBULSKI. — Ueber die Funktion der Nebennieren. — *Wiener med. Woch.*, 1895-214.
- [55] DEBUCQUET. — Solution d'adrénaline pour injection. — *J. P. C.*, 1922-(7^e s.)-25-136.
- [56] DENIGÈS. — Réactions colorées de l'adrénaline. — *B. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1918-185.
- [57] ELLIOTT T. R. — Note on the quantitative estimation of adrenalin. — *J. of P.*, 1913-46-xv.
- [58] EWINS. — Some colour reactions of adrenin and allied bases. — *J. of P.*, 1910-40-317.
- [59] EWINS and LAIDLAW. — The alleged formation of adrenin from tyrosine. — *J. of P.*, 1910-40-275.
- [60] FABRE R. — Propriétés chimiques et physiologiques des principes endocriniens. — *J. P. C.*, 1926-(8^e s.)-4-77.
- [61] FENGER F. — On the presence of active principles in the Thyroid and Suprarenal glands before and after birth. — *J. Biol. Ch.*, 1912-11-489; 12-55.

- [62] FOLIN O., CANNON W. B. and DENIS W. — A new colorimetric method for the determination of epinephrin. — *J. Biol. Ch.*, 1912, 1913-13-477.
- [63] FUHRMANN F. — Der feinere Bau der Nebenniere des Meerschweinchens. — *Zeit. f. Wissensch. Zoologie*, 1905-78, d'après TOUJAN [134].
- [64] FUJII Ij. — Do the blood sugar level, the glycogen content of liver and muscle, and the epinephrin content of the suprarenals in the rabbit undergo a seasonal variation. — *Tohoku J. of Exp. Med*, 1924-5-405.
- [65] FUJII Michio. — Action de l'extrait cortical. — *Folia japon. pharm.* 1926, d'après *Ch. Abstracts*, 1927-21-3077.
- [66] GLEY E. — Quatre leçons sur les sécrétions internes. *Paris* 1920.
- [67] GLEY E. — La Physiologie surrénale et la sécrétion d'adrénaline. — *Rev. Méd.*, 1923-40-193.
- [68] GLEY E. — Les grands problèmes de l'endocrinologie. — *Baillière, Paris* 1926.
- [69] GLEY E. et QUINQUAUD A. — Du rôle physiologique supposé de l'adrénaline. — *J. Phys. et Path. gén.*, 1918-17-807.
- [70] GOJON P. — Contribution à l'étude des glandes surrénales et des produits opothérapiques surrénales. *Th. Pharm. Lyon* 1927.
- [71] GRIMBERT et LECLÈRE. — Caractérisation de l'apomorphine. — *J. P. C.*, 1915-(7^e s.)-11-23.
- [72] GRYNFELTT. — Recherches anatomiques et histologiques sur les organes surrénaux des Plagiostomes. — *Th. Sc. Paris*, 1903.
- [73] HARTMANN F. and HARTMANN W. — The production of epinephrin by the adrenal cortex. — *Am. J. Physiol.*, 1923-65-623.
- [74] HENLE. — *Ztsch. f. ration. Medizin*, 1865-24, d'après VERNE [139].
- [75] HOUSSAY et MOLINELLI. — Anaphylaxie et décharge d'adrénaline. — *S. B.*, 1925-93-1638.
- [76] JENSEN and CHEN K. K. — A chemical study of Ch'an Su, the dried venom of the Chinese toad, with special reference to the isolation of epinephrin. *J. Biol. Ch.*, 1929-82-397.
- [76*] JOSUÉ et BLOCH. — Action hypertensive de la couche

- corticale des capsules surrénales. — *C. R.*, 1907-144-1295.
- [77] KOHN. — *Prager mediz. Wochensch.*, 1898, d'après VERNE [139].
- [78] KURIYAMA S. — The epinephrin content of the adrenals in various experimental conditions. — *J. Biol. Ch.* 1918-34-299.
- [79] LAGUESSE. — Trois leçons sur les glandes à sécrétion interne en général. — *Echo Médical du Nord*, 12 sept. 1925.
- [80] LAIGNEL-LAVASTINE. — Application de l'imprégnation argentique de Cajal à l'étude histochimique de la cellule médullo-surrénale. — *S. B.*, 1905-57-661.
- [81] LANGERON, PAGET et LOHÉAC. — Note sur l'existence d'adrénaline à l'état libre et à l'état virtuel dans les surrénales humaines prélevées après la mort. Influence de la cadavérisation. — *S. B.*, 1928-98-1424.
- [82] LANGLOIS. — Sur les fonctions des capsules surrénales. *Th. Sc. Paris* 1897.
- [83] LAUNOY. — Adrénaline de synthèse. — *S. B.*, 1923-88-848.
- [84] LEULIER A. et GOJON P. — Sur la teneur en adrénaline des solutions d'adrénaline au 1/1000 et des poudres de surrénales commerciales. — *B. S. P.*, 1927-34-263.
- [85] LEULIER A. et GOJON P. — De la teneur en adrénaline des surrénales de divers animaux et de produits opothérapiques surrénaliens. — *Soc. Pharm. Lyon.* in *Bull. Pharm. de l'Est*, mars 1927.
- [86] LEULIER A. et GOJON P. — Sur la teneur en adrénaline des capsules surrénales de différents Mammifères. — *S. B.*, 1927-96-547.
- [87] LEULIER A. et REVOL L. — Sur la localisation de l'adrénaline virtuelle. — *C. R.*, 1930-190-452.
- [88] LEWIS. — The presence of epinephrin in human foetal. — *J. Biol. Ch.*, 1916-24-249.
- [89] LOHÉAC P. — Les tumeurs des capsules surrénales. Etude de leurs rapports avec l'hypertension artérielle. Le dosage de l'adrénaline dans les capsules surrénales. — *Th. Méd. Lille* 1928.
- [90] LOEWENTHAL K. — Die Vereinigung von Interrenal- und Adrenalsystem zur Gesamtnebenniere. Die Neben-

- niere als einheitlich funktionierendes Organ. — *Berlin, klin. Woch.*, 1920-57-807.
- [91] LUCKSH F. — Ueber den Adrenalingehalt der Nebennieren des Menschen bei verschiedenen Todesursachen. — *Virchow's Arch.* 1917-223-290.
- [92] LUTZ and WYMAN. — The chromophil tissue and the interrenal bodies of Elasmobranchs and the occurrence of adrenin. — *J. exp. Zool.*, 1927, *d'après Endoc.*, 1928-12-508.
- [93] MAIWEG H. — Ueber die pharmakologische und kolorimetrische Auswertung reiner und zersetzter Adrenalinlösungen sowie von Nebennierenauszügen. — *Bioch. Zeitsch.*, 1923-134-292.
- [94] MANCEAU P. — Contribution à l'étude de l'anesthésie générale. — *Th. Ph. Sup. Lyon*, 1925.
- [95] MOLINELLI E. A. et MAZZOCCO P. — Sur la prétendue existence d'une adrénaline virtuelle dans les capsules surrénales. — *S. B.*, 1928-99-1001.
- [95*] MOORE. — On the chemical nature of a physiologically active substance occurring in the suprarenal glands. — *J. of P.*, 1894-1895-17-XIV.
- [96] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — L'adrénaline existentielle à l'état totalement libre dans les surrénales fraîches. — *C. R.*, 1926-183-1353.
- [97] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Sur la teneur en adrénaline des surrénales chez le cobaye privé de vitamine C. — *S. B.*, 1927-96-548.
- [98] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Adrénaline des surrénales et cadavérisation. — *S. B.*, 1927-96-1115.
- [99] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Adrénaline des surrénales et produits opothérapiques. — *Bull. Ac. Méd.* 1927-97 n° 20.
- [100] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — L'adrénaline des capsules surrénales. Valeur des divers procédés de conservation. — *Bull. Ac. Méd.* 1927-98 n° 43.
- [101] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — L'adrénaline virtuelle. *P. M.* 29 juin 1927.
- [102] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Sur la teneur en adrénaline des capsules surrénales dans l'inanition totale. — *S. B.*, 1928-99-280.
- [103] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Sur l'adrénaline virtuelle. — *S. B.*, 1928-99-1309.
- [104] MOURIQUAND G., LEULIER A. et SÉDALLIAN P. — Toxine

- diphtérique et adrénaline des surrénales. — *C. R.* 1927-184-1359.
- [105] MOURIQUAND G., LEULIER A. et SÉDALLIAN P. — Toxine tétanique et adrénaline des surrénales. — *S. B.* 1927-97-500.
- [106] MOURIQUAND G., LEULIER A. et SÉDALLIAN P. — Toxine botulique, choc anaphylactique et composition chimique des surrénales. — *S. B.*, 1929-100-682.
- [107] MULON P. — Réaction de Vulpian au niveau des corps surrénaux des Plagiostomes. — *S. B.*, 1903-55-1156.
- [108] MULON P. — Spécificité de la réaction chromaffine : glandes adrénalinogènes. — *S. B.*, 1904-56-113.
- [109] MULON P. — Sur une réaction de l'adrénaline in vitro. Son application à l'étude des surrénales. — *S. B.*, 1904-56-115.
- [110] NOVARO. — Action pharmacodynamique du venin de crapaud. — *S. B.*, 1923-88-371.
- [111] OKUDA M. — The adrenalin content of the suprarenal capsule of the chick embryo. — *Endoc.*, 1928-12-342.
- [112] OLIVER G. and SCHAFER E. S. — On the Physiological action of Extracts of the Suprarenal Capsules. — *Proc. Physiol. Soc.*, march. 10, 1894, and *J. of P.*, 1894-1895-17-IX.
- [113] OLIVER G. and SCHAFER E. S. — The Physiological Effects of Extracts of the Suprarenal Capsules. — *J. of P.*, 1895-18-230.
- [113*] PAGET et LEBLOND. — L'adrénaline des Surrénales. Adrénaline virtuelle. — *J. Sc. Méd. Lille*, 4 janv. 1931.
- [114] PAGET et LOHÉAC. — Note sur une technique de recherche de l'adrénaline dans les capsules surrénales après la mort. — *S. B.*, 1928-98-1421.
- [115] PHARMACOPŒIA of the U. S. — sept. 1916-IX-608.
- [116] PITINI. — Chloronarcose et fonctions surrénales, d'après *Arch. ital. Biol.*, 1923-72-161.
- [117] POLONOWSKI Michel. — La synthèse organique dans le monde végétal. — *B. Soc. Ch. Biol.*, 1925-7-526.
- [118] PRENANT A. — Méthodes et résultats de la microchimie. — *J. Anat. Phys.*, 1910-46-343.
- [119] RÉGNIER. — Adrénaline et capsules surrénales. — *B. S. P.*, 1925-32-661.

- [120] RICHARD et MALMY. — Sur la préparation et la conservation des solutions d'adrénaline. — *J. P. C.*, 1921 (7^e s.)-23-209.
- [121] RICHAUD. — Remarques sur quelques points de technique dans la méthode de contrôle physiologique des produits adrénaliniques. — *J. P. C.* 1922 (7^e s.)-25-289.
 — Sur la limite d'exactitude de la méthode de contrôle physiologique des adrénalines. — *Ibid*, p. 369.
- [122] ROBIN Ch. — Leçons sur les humeurs normales et morbides. — *Paris* 1867.
- [123] ROGER H. — Les substances hypotensives des capsules surrénales. — *S. B.*, 1910-69-160.
- [124] SAITO Sh. — On the presence of epinephrin in the suprarenal bodies in human and bovin fœtuses. — *Tohoku J. of Exp. Med.* 1928-1929-12-254.
- [125] SAJOUS. — Active cooperation between the physiologist and the clinician and comparative analysis of coordinated data in the study of the interrenal secretion. — *Endoc.* 1918-2-258.
- [126] SALVIOLI L. et PEZZOLINI P. — Sur le mode différent d'agir des extraits médullaires et corticaux des capsules surrénales. — *Arch. ital. Biol.* 1902-37-380.
- [127] SOMMELET. — L'adrénaline. — *B. S. P.* 1910-17-646.
- [128] STILLING. — *Anat. Anz.* 1898-15, d'après VERNE [139].
- [129] STOELTZNER W. — Die Chromreaktion des chromaffinen Gewebes als Adrenalinreaktion. — *Münch. med. Wochensch.* 1919-66-584.
- [130] SUGAWARA T. — Comparison of assays of adrenalin in the suprarenal extracts from oxen, pigs, cats, dogs and rabbits, by means of the cat paradoxical reaction, the rabbit intestine segment method and the colorimetric method of Folin, Cannon and Denis. — *Tohoku J. of Exp. Med.*, 1928-11-410.
- [131] SZYMONOWICZ. — Die Funktion der Nebenniere. — *Pflüger's Arch.* 1896-64-97.
- [132] TAKAMINE. — The active principle of the suprarenal glands and its mode of preparation. — *Am. J. Pharm.*, 1901-73-523.
- [133] TIFFENEAU M. — Nécessité du contrôle physiologique de l'adrénaline et des préparations de surrénales. — *J. P. C.* 1921-(7^e s.)-23-313 et 366.
- [134] TOUJAN G. — Recherches expérimentales sur l'adré-

- naline. (Dosage, formation, origine, destruction) — *Th. Méd. Toulouse* 1905.
- [135] TOURNADE A. et CHABROL M. — L'adrénalémie. — *Rev. Méd.*, 1923-40-222.
- [136] VACEK T. — Sur la photo-oxydation et la chimio-oxydation des solutions commerciales d'adrénaline. — *S. B.*, 1929-100-583.
- [137] VACEK T. — L'importance du degré de dissociation des acides dans l'oxydation de l'adrénaline. — *S. B.* 1929-100-585.
- [138] VASARHELYI B. — Effets des extraits corticaux. — *Magyar Orv. Arch.* 1926, d'après *Ch. Abstracts* 1927-21-136.
- [139] VERNE J. — La réaction chromaffine en histologie et sa signification. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1923-5-227.
- [140] VIALE G. — Fonction cholinigène des capsules surrénales. — *S. B.* 1928-98-177.
- [141] VINCENT SW. — Innere Sekretion und Drüsen ohne Ausführungsgang. Die innere Sekretion der Nebennieren. — *Ergebnisse der Physiologie* 1910-9-509, d'après BARGER [33].
- [142] VIRCHOW. — Zur Chemie der Nebennieren. — *Virchow's Archiv* 1857-12-481.
- [143] VULPIAN. — Note sur quelques réactions propres au tissu des Capsules Surrénales. — *C. R.*, 1856-43-663.
- [144] WATANABE M. and SATO H. — Colorimetric and biological estimation of the adrenalin content of suprarenal, particularly the cortical extract of normal rabbits. — *Tohoku J. of Exp. Med.* 1928-11-433.

LIPIDES ET SURRÉNALES

- [145] ALBRECHT H. und WELTMANN O. — Ueber das Lipoid der Nebennierenrinde. — *Wiener klin. Wochenschr.* 1911-24-483.
- [146] ASCHOFF. — Zur Morphologie der lipoiden Substanzen. Ein Beitrag zur Verfettungsfrage. — *Beiträge zur Path. Anat. u. z. allgemeinen Path.* 1910-47-1.
- [147] AUTENRIETH W. und FUNK A. — Ueber kolorimetrische Bestimmungsmethoden : Die Bestimmung des Ge-

- samtcholesterins im Blut und in Organen. — *Muench. mediz. Wochenschr.*, 1913-60-1243.
- [148] BABÈS V. — Rapport entre le pigment, la graisse et les formations cristallines. — *S. B.*, 1908-64-83.
- [149] BABÈS V. et JONESCO V. — Distribution de la graisse dans les Capsules surrénales. — *S. B.* 1908-65-237.
- [150] BAGINSKI. — Influence de la résection du nerf vague sur la lipoidogénèse des Capsules surrénales de Mammifères. — *B. Hist. Appl.*, 1926-3-185.
- [151] BAUMANN E. J. — On the estimation of organic Phosphorus. — *J. Biol. Chem.*, 1924-59-667.
- [152] BAUMANN E. J. and HOLLY O. M. — The relation of lipoids to suprarenal Physiology. I. The cholesterol and lipoid phosphorus contents of the blood of rabbits before and after surrenalectomy. — *J. Biol. Chem.*, 1923-55-457.
- [153] BEHRENS-KLEY. — Optische Untersuchung von Mineralkörnern. Mikrochemische Analyse. — *Leipzig*, 1920.
- [154] BELIN P. — Généralité de la distinction entre deux catégories de matières grasses. Elément constant et élément variable. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1926-8-1081.
- [155] BERNARD L., BIGART et LABBÉ H. — Sur la sécrétion de lécithine par les capsules surrénales. — *S. B.* 1903-55-126.
- [156] BLOOR W. R. — Outline of a classification of the Lipoids. — *Proceed. Soc. Exp. biol. med.*, 1920-17-138, d'après *Ch. Abstracts* 1921-15-2452.
- [157] BLOOR W. R. — The oxydative determination of phospholipids in blood and tissues. — *J. Biol. Chem.* 1929-82-273.
- [158] Mlle LE BRETON. — Sur la présence et le dosage dans le P lipoïdique total éthéro-soluble de composés phosphorés autres que les phosphatides. — *B. S. Ch. Biol.* 1921-3-539.
- [159] BRIDEL M. — La Réforme de la Nomenclature en Chimie biologique. Etat de la question à la fin de 1926. — *B. S. Ch. Biol.*, 1926-8-1211.
- [160] BRUNSWIK. — Die Grenzen der mikrochemischen Methoden in der Biologie. — *Naturwissenschaften* 1923, d'après *Biolog. Abstracts* 1925-1852.
- [161] CAMINADE R. — Sur quelques modifications apportées.

- au dosage de la cholestérine par la méthode de Windaus. — *B. Soc. Ch. Biol.*, 1922-4-601.
- [162] CASTALDI. — Recherches histologico-biométriques sur les capsules surrénales du cobaye. — *Arch. fisiologia* 1924, d'après *Arch. ital. Biol.* 1924-74-159.
- [163] CHAUFFARD, G. LAROCHE et GRIGAUT. — La teneur en cholestérine des Capsules surrénales dans différents états pathologiques. — *S. B.* 1912-73-23.
- [164] CHAUFFARD, G. LAROCHE et GRIGAUT. — id. — *S. B.* 1914-76-529.
- [165] CHAUFFARD, G. LAROCHE et GRIGAUT. — La teneur en cholestérine des surrénales aux différents stades de la vie fœtale. — *S. B.*, 1918-81-87.
- [166] CHAUFFARD, G. LAROCHE et GRIGAUT. — Le cycle de la cholestérine dans l'organisme. — *Ann. méd.* 1920-8-150.
- [167] CIACCIO C. — Les lipoides intracellulaires. — *Biol. médicale*, 1912 n° 7 et 8.
- [168] CIACCIO C. — Contribution à la fonction de l'écorce surrénale. I. Considérations générales et recherches biochimiques. — *Arch. ital. Biol.*, 1915-63-341.
- [169] CLEVERS et GOORMATIGH. — La cortico-surrénale dans la diphtérie. — *Bull. Ac. Royale Méd. Belgique*, 1922-2-425.
- [170] CONNOR. — Identification des lipoides des tissus. — *Amer. J. Path.* 1928, d'après *Ch. Abstracts* 1928-22-4141.
- [171] CREMA C. — Sul comportamento dei lipoidi totali, del P lipoideo e dell'adrenalina delle capsule surrenali nella morti tardive per ustione. — *Boll. biol. sper.* 1928-3-59.
- [173] DADDI L. — Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus. — *Arch. ital. Biol.* 1896-26-143.
- [174] DASTRE. — Recherches sur les corps biréfringents de l'œuf des ovipares. — *Th. Sc. Nat. Paris* 1876.
- [175] DENIGÈS G. — Recherche microchimique de la cholestérine. — *Gazette hebd. sc. méd. Bordeaux* 1913-44-314.
- [176] DOREE et GARDNER. — Dosage de la cholestérine à l'état de benzoate, d'après FRÉCHIN [183].
- [177] FABRE R. — Sur l'allophanate de cholestérol et son emploi en chimie biologique. — *J. P. C.*, 1927-(8° s.)-5-21.

- [178] FAURÉ-FRÉMIET, MAYER et SCHAEFFER. — Sur la microchimie des corps gras. — *Arch. Anat. microsc.* 1910-12-19.
- [179] FEX J. — Chemische und morphologische Studien über das Cholesterin und das Cholesterinester in normalen und pathologisch veränderten Organen. — *Bioch. Zeitsch.*, 1920-104-82.
- [180] FIELD and ALSBERG. — A study of the birefringence and the staining of agar-agar and of gelatine. — *J. Biol. Chem.* 1925-63-XLII.
- [181] FONTÈS. — Hydrophilie de l'axonge cholestérinée. Essai de pathogénie et de thérapeutique in vitro des œdèmes irréductibles. — *Th. Méd. Montpellier*, 1919.
- [182] FOURNEAU. — Les phosphatides. — *B. Soc. Ch. Biol.*, 1920-2-67.
- [183] FRÉCHIN. — Sur la Cholestérine. — *Th. Ph. Nancy*, 1927.
- [184] GARDNER and GAINSBOROUGH. — Studies on the cholesterol content of normal human plasma. — *Bioch. J.* 1927-21-130.
 — The attraction of proteins of plasma for sterols. *Ibid.* p. 141.
- [185] GARDNER and WILLIAMS. — *Bioch. J.* 1921-15-363.
- [186] GAUBERT. — Cristaux liquides des composés du cholestérol et de l'ergostérol. — *C. R.* 1907-145-722; 1909-149-608; 1913-156-149.
- [187] GÉRARD E. — Contribution à l'étude de la cholestérine animale et végétale. — *Th. Méd. Toulouse* 1895.
- [188] GÉRARD E. — Solubilité de la cholestérine animale dans quelques éléments de la bile. Contribution à l'étude de la formation des calculs biliaires. — *S. B.* 1905-57-348.
- [189] GÉRARD E. — Sur le dosage des lipoides dans les tissus et les organes animaux. — *S. B.* 1911-71-590.
- [190] GRIGAUT. — Les « protéo-cholestérides » du sérum et leur dédoublement en vue de l'extraction totale de la cholestérine. — *S. B.*, 1912-72-912.
- [191] GRIGAUT. — Le Cycle de la Cholestérinémie. — *Th. Méd. Paris* 1913.
- [192] HARTMAN. — A substance which prolongs the life of adrenalectomized cats. — *Proc. Soc. Exp. biol and med.*, 1927, d'après *Endoc.* 1928-12-91.
- [193] HESS, THAYSEN. — Chimie physiologique du cholestérol.

- térol et de ses éthers. — *Zent. Bioch. v. Bioph.* 1914, d'après *Ch. Abstracts* 1914-8-1606.
- [194] HOUSSAY B. A. et LEWIS J. T. — Importance comparative des parties corticale et médullaire des Capsules surrénales. — *S. B.*, 1921-85-1210.
- [195] HOUSSAY B. A. et LEWIS J. T. — Les fonctions des chiens privés de la substance médullaire des Capsules surrénales. — *S. B.*, 1922-87-565.
- [196] HUGOUNENQ et COUTURE. — Photoactivité des stérols. — *C. R.* 1929-188 pp. 349, 742; 189-47.
- [197] ISCOVESCO. — Du dosage et de l'extraction des lipoides saponifiables. — *S. B.* 1911-71-700.
- [198] ISCOVESCO. — Sur les propriétés d'un lipotide extrait de la portion corticale des Capsules surrénales. — *S. B.* 1913-75-510.
- [199] ISCOVESCO. — Propriétés d'un lipotide extrait de la médullaire des surrénales. — *S. B.* 1913-75-548.
- [200] JAVILLIER M. — Le P nucléique des tissus et sa détermination quantitative. — *B. Soc. Ch. Biol.*, 1929-11-644.
- [201] JAVILLIER M. et ALLAIRE H. — Sur le dosage du P nucléique dans les tissus animaux. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1925-7-486.
- [202] JAVILLIER M. et ALLAIRE H. — Sur l'existence d'un indice de P nucléique des tissus. — *B. Soc. Ch. Biol.*, 1926-8-924.
- [203] JAVILLIER M. et ALLAIRE H. — Quelques rapports entre l'indice de P nucléique et d'autres indices phosphorés des tissus. — *B. Soc. Ch. Biol.*, 1927-9-772.
- [204] JAVILLIER M., ALLAIRE H. et Mme HINGLAIS-GROC. — Analyse de poudres organothérapiques. Leur teneur en P total, lipidique et nucléique. — *B. S. P.* 1925-32-641.
- [206] JULIO G. — Contribucion al estudio del metabolismo de la colesterino. — *Prensa med. arg.* 1923, d'après *Endoc.* 1924-8-130.
- [207] KAWAMURA. — Die cholesterinester Verfettung. — *Iena* 1911.
- [208] KOLLIKER. — Traité complet du développement de l'homme et des animaux supérieurs. *Paris* 1882, traduit par A. Scheider, d'après SOULIÉ [18].
- [209] KLEIN und PIRSCHLE. — Nachweis und Verbreitung

- der Phytosterine im Milchsaff. — *Bioch. Zeitschr.* 1923-143-457.
- [210] KOFLER L. — Die Saponine. — *Wien* 1927.
- [211] KOFLER L. et RAUM. — Sur la précipitation de différentes saponines par les stérines. — *Bioch. Zeitschr.* 1930; d'après *J. Pharm. Belg.* 1930-660.
- [212] KUHLE. — Expériences sur l'action de l'hormone de la cortico-surrénale. — *Arch. f. d. ges. Phys.*, d'après *Endoc.* 1927-11-46.
- [213] KUMAGAWA M. und SUTO K. — Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden. — *Bioch. Zeitschr.* 1908-8-212.
- [214] LAIGNEL-LAVASTINE. — Disparition des enclaves lipocholestériques de la surrénale humaine dans l'agitation motrice. — *S. B.* 1918-81-324.
- [215] LANDAU M. — Nebenniere und Fettstoffwechsel. — *Deuts. med. Woch.* 1913-39-546.
- [216] LANGERON. — Précis de microscopie. — *Masson, Paris*, 1925.
- [217] LAPICQUE L. — Origines françaises du procédé dit de Neumann : Incinération par les acides sulfurique et azotique. — *S. B.* 1919-82-92.
- [218] LATTES. — L'écorce surrénale dans la mort tardive à la suite de brûlures. — *Arch. ital. Biol.* 1915-64-123.
- [219] LAUDAT. — Etude des lipoides et des matières grasses du sérum. — *Th. Pharm. Paris* 1913.
- [220] Mac LEAN. — Lecithin and allied substances. The lipins. — *Monograph on biochemistry, New-York* 1918.
- [221] LEMATTE, BOINOT et KAHANE. — La composition minérale des tissus de l'homme et des animaux. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1928-10-553.
- [222] LEMELAND P. — Recherches chimiques et physiques sur les matières grasses et les lipoides du sang. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1921-3-134.
- [223] LEMELAND P. — Recherches sur le dosage des lipoides dans le sang et les tissus. Observations sur le dosage du P lipoidique total dans les tissus. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1923-5-110.
- [224] LEULIER A. et DÉCHANET J. — Teneur en cholestérol

- des organes du jeune chat pendant les cinq premières semaines. — *S. B.* 1926-95-1369.
- [225] LEULIER A. et NOEL R. — Détection histochemique de la cholestérine. — *B. Hist. Appl.* 1926-3-316.
- [226] LEULIER A. et REVOL L. — Sur la répartition du cholestérol et de ses éthers dans les capsules surrénales. — *C. R.* 1930-190-657.
- [227] LEULIER A. et REVOL L. — Sur la répartition de quelques principes immédiats dans les capsules surrénales de porc. — *S. B.* 1930-103-1136.
- [227*] LEULIER A. et REVOL L. — Sur le cholestérol des surrénales : détection histochemique et dosages chimiques. — *B. Hist. Appl.* 1930-7-241.
- [228] LEVENE. — Structure and significance of Phosphatides. — *Physiol. Reviews*, 1921-1-327.
- [229] MACHEBŒUF. — Recherche sur les lipides, les stérois et les protéides du sérum et du plasma sanguin. *Th. Sc. Paris* 1928.
- [230] MANGEAU P. — Sur le dosage des « lécithines » et de la cholestérine dans les organes sous l'influence des anesthésiques totaux. — *S. B.* 1925-92-1507.
- [231] MAUGUIN M. — Les cristaux liquides, dans *les Progrès de la physique moléculaire*. — Gauthiers-Villars édit. 1914.
- [232] MAYER A., MULON P. et SCHAEFFER G. — Contribution à la microchimie des surrénales. — *S. B.* 1912-73-p. 313 (cheval), p. 315 (mouton).
- [233] MAYER A. et SCHAEFFER G. — Composition chimique du sang et hémolyse. — *C. R.* 1912-155-728.
- [234] MAYER A. et SCHAEFFER G. — Dosage de la cholestérine par les méthodes de Kumagawa-Suto et Windaus combinées. — *S. B.* 1912-72-362.
- [235] MAYER A. et SCHAEFFER G. — Recherche sur la teneur des tissus en lipoides : existence possible d'une constance lipocytyque. — *J. Ph. et Path. gén.* 1913-15-510.
- [236] MAYER A. et SCHAEFFER G. — Recherches sur la teneur des tissus en lipoides : existence possible d'une constante lipocytyque; 2° mémoire. — *J. Ph. et Path. gén.* 1913-15-534.
- [237] MAYER A. et SCHAEFFER G. — Teneur des tissus en phosphore lié aux lipoides. 3° mémoire. — *J. Ph. et Path. gén.* 1913-15-773.

- [238] MAYER A. et SCHAEFFER G. — Recherches sur les constantes cellulaires. Teneur des cellules en eau; l'eau constante cellulaire (1^{er} article). — *J. Ph. et Path. gén.* 1914-16-1.
- [239] MAYER A. et SCHAEFFER G. — L'eau constante cellulaire (2^e article) : Rapport entre la teneur des cellules en lipoides et leur teneur en eau. — *J. Ph. et Path. gén.* 1914-16-23.
- [240] MELLANOFF I. S. — Digitonine. — *Am. J. Pharm.* 1927, d'après *Ch. Abstracts* 1927-21-3706.
- [241] MICHAIL et VANCEA. — Métabolisme de la cholestérine dans les organes au cours de l'intoxication naphthalénique. — *S. B.* 1927-97-1097.
- [242] MILLON E. — Nouveau moyen de détruire les matières organiques et d'en isoler la partie minérale. — *C. R.* 1864-59-195.
- 243 MIRANDE. — Sur la nature des stérinoplastes du lis blanc. — *C. R.* 1923-176-769.
- 244 MOERS. — Ueber den ferneren Bau der Nebenniere. — *Arch. f. Path. Anat. u. Phys.* 1864-29-336.
- [245] MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Contribution à l'étude du « terrain » en pathologie. Recherches biochimiques sur le terrain carencé. — *Paris Médical* 7 mai 1927.
- 246 MOURIQUAND G. et LEULIER A. — Cholestérine et intoxication oxycarbonée et arsénée. — *S. B.* 1927-97-498.
- [247] MOURIQUAND G., LEULIER A. et SÉDALLIAN P. — Toxine diphtérique et cortico-surrénale. — *S. B.* 1928-99-1923.
- [248] MOURIQUAND G., LEULIER A. et SÉDALLIAN P. — Action de la toxine tétanique sur la cortico-surrénale. — *S. B.* 1928-99-1924.
- [249] MUELLER H. — On the solubility of cholesterol-digitonide. — *J. Biol. Chem.* 1917-30-39.
- [250] MULON P. — Localisation de la lécithine dans les capsules surrénales de cobaye. — *S. B.* 1903-55-82.
- [251] MULON P. — Parallélisme entre le corps jaune et la cortico-surrénale chez le cobaye. — *S. B.* 1906-58-(2^e)-292.
- [252] MULON P. — Importance fonctionnelle du pigment dans la capsule surrénale. — *S. B.* 1907-62-905.

- [253] NEUMANN. — *Archiv. f. (Anat. u.) Physiol.* 1900-159, d'après LAPICQUE [217].
- [254] OVERTON. — Studien über die Narkose. — *Iena* 1901.
- [255] PARAT M. — Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasma. — *Archives Anat. microsc.* 1928-24 n° 2 et 3.
- 256 PATZELT. — Animale Histochemie. — *Fortschritte der Mikrochemie; Klein und Strebinger; Wien* 1927.
- [257] PÉNAU H. et HARDY Z. — Etude du complexe digitono-side-ergostérol. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1929-11-437.
- 258 POLICARD A. — Quelques données sur la cholestérine et sa mise en évidence dans les cellules et les tissus. — *Bull. Soc. Med. Hôp. Lyon*; 1914-12-402.
- 259 POLICARD A. — Recherches histochimiques sur le métabolisme de l'urée dans le rein. — *S. B.* 1915-78-32.
- 260 POLICARD A. et LEULIER A. — Sur les méthodes de détection du P dans les tissus. — *B. Hist. Appl.* 1925-2-22.
- [261] PORAK R. — La glande cortico-surrénale. — *Rev. franç. d'Endoc.* 1925-102 et 249.
- [262] POSTERNAK. — Au sujet du rapport de M. Javillier aux Journées de chimie biologique : Le P nucléique des tissus et sa détermination quantitative. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1929-11-787.
- [263] RABBENO. — Influence des facteurs climatiques sur le contenu cholestérolique du sang et des capsules surrénales. — *Arch. Sc. Biol.* 1926, d'après *Ch. Abstracts* 1927-21-3389. — Cf. aussi *Ch. Abstracts* 1927-21-2303.
- [264] RANGLES F. S. and KNUDSON A. — Studies on cholesterol. III. The relation of the suprarenal gland and the spleen to cholesterol metabolism. — *J. Biol. Chem.* 1928-76-89.
- [265] Mme RANDOIN et Mlle MICHAUX. — Variations comparatives de la teneur des surrénales en eau, acides gras et cholesterol chez le cobaye normal et le cobaye soumis à un régime déséquilibré par absence de vitamine antiscorbutique. — *C. R.* 1926-183-1055.
- [266] RANSOM F. — Saponin und sein Gegengift. — *Deutsch. med. Woch.* 1901-27-194.
- [267] REICHARD. — Réactions de la digitonine. — *Pharm. Zentr.* 54-217, d'après *Ch. Abstracts* 1913-7-3191.

- [268] ROMIEU. — Détection histochimique de la cholestérine. — *S. B.* 1925-92-787.
- [269] ROMIEU. — Une réaction histochimique des léci-thines : la réaction indophile. — *C. R.* 1927-184-1206.
- [270] ROSENHEIM O. and TEBB Ch. — On the lipoids of the adrenals. — *Proceed. Physiol. Soc. : J. of. Ph.* 1909-38-p. LIV.
- [271] ROTHSCHILD M. A. — Zur Physiologie des Cholesterinstoffwechsels. III Die Beziehungen der Nebenniere zum Cholesterinstoffwechsel. — *Beit. path. Anat. u. allg. Path.* 1915-60-39.
- [272] SCHULTZ A. — Eine Methode des mikrochemischen Cholesterinnachweises am Gewebsschnitt. — *Centb. f. allg. Path. u. Path. Anat.* 1924-35-314.
- [273] SORG K. und JAFFE R. — Lipoiduntersuchungen an den Nebennieren des Rindes. — *Centb. f. allg. Path. u. Path. Anat.* 1924-35-352.
- [274] STOCKER A. — Cholesteringehalt der Kupfferschen Sternzellen. Histochemische Reaktion. — *Deutsch. med. Woch.* 1922-48-93.
- [275] TANGE U. and Mc COLLUM. — The allophanates of sterols. — *J. Biol. Chem.* 1928-76-445.
- [276] TERROINE E. F. — Contribution à l'étude de la physiologie des substances grasses et lipidiques. — *Th. Sc. Paris* 1919.
- [277] TERROINE E. F. et BELIN P. — L'élément constant des lipides. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1927-9-12.
- [278] TERROINE, HATTERER et ROEHRIG. — Les acides gras des phosphatides des tissus d'homéothermes sont-ils indépendants de la nature de l'alimentation ? — *B. Soc. Ch. Biol.* 1930-12-674.
- [279] TERROINE E. F. et Mlle J. WEILL. — Indice lipocytyque des tissus au cours d'états physiologiques variés (inanition, alimentation). — *J. Phys. et Path. gén.* 1913-15-549.
- [280] THAYSEN and HESS Th. — Der Gehalt normaler Organe an Cholesterin und Cholesterinester. — *Bioch. Zeitsch.* 1914-62-115.
- [281] UNNA P. G. und GOLODETZ L. — Die Hautfette. — *Bioch. Zeitsch.* 1909-20-469.
- [282] VERDOZZI. — Capsules, surrénales et allaitement. — *Arch. ital. Biol.* 1916-66-121.

- [283] VINCENT SW. — Recent views as to the functions of the adrenal bodies. — *Endoc.* 1917-1-140.
- [284] WACKER und HUECK. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 1913, d'après CHAUFFARD, G. LAROCHE et GRIGAUT [166].
- [285] WAGNER H. — Cephaline et autres lipoides de l'écorce des capsules surrénales. — *Bioch. Zeitung* t. 64-72, d'après *Ch. Abstracts* 1914-3586.
- [286] WELTMANN. — Sur les lipoides biréfringents des surrénales. — Dans *Fortschritte der Mikrochemie, Klein et Strebingen, Wien* 1927.
- [287] WHEELER and VINCENT. — The question of the relative importance to life of cortex and medulla of the adrenal bodies. — *Trans. Roy. Soc. Canada* 1917, d'après *Endoc.* 1919-3-39.
- [288] WINDAUS A. — Ueber die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. — *Ber. d. Deutsch. Ch. Ges.* 1909-42-238.
- [289] WINDAUS A. — Ueber die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. — *Hoppe-Seyler's Zeitsch. f. Phys. Ch.* 1910-65-110.
- [290] WINDAUS A. et WEINHOLD R. — Sur quelques composés d'addition de la digitonine. — *Zeitsch. Ph. Ch.* 1923, d'après *Biolog. Abstracts* 1925-1879.
- [291] WOODHOUSE D. L. — The fat, lipins and cholesterol constituents of adrenals and gonads in cases of mental disease. — *Bioch. J.* 1928-22-1087.
- [292] YAGI. — Sur une combinaison de la saponine avec la cholestérine. — *Arch. exp. Path. u. Pharm.* 1910-64-141.

SOUFRE, AZOTE, POTASSIUM ET SURRENALES

- [293] BARRAL Et. et Ph. — Précis d'analyse biologique clinique. Urine. — *Baillière, Paris* 1929.
- [294] BAUMANN and KURLAND S. — Changes in the inorganic constituents of blood in suprarenalectomized cats and rabbits. — *J. Biol. Chem.* 1926-1927-71-281.
- [295] BINET L. et GIROUD A. — Glandes surrénales et glutathion. — *S. B.* 1928-98-434.

- [296] BERTRAND G. et SILBERSTEIN L. — Sur le dosage du soufre contenu dans la terre arable. — *B. Soc. Ch.* 1927-41-950.
- [297] BLANCHETIÈRE A. — Le soufre protéique, le glutathion et le philothion. — *Progrès Médical* 1926-1713, n° 46.
- [298] BLANCHETIÈRE A. et BINET L. — Teneur en glutathion réduit de quelques glandes de chien. — *S. B.* 1926-95-621.
- [299] BLANCHETIÈRE et MÉLON. — Sur le dosage du glutathion. — *S. B.* 1927-97-242.
- [300] DAMAS L. — Le glutathion. — *B. S. P.* 1930-37-501.
- [301] FABRE R. — Le glutathion. — *J. P. C.* 1927-(8° s.)-5-219 et 245.
- [302] FLURIN H. — Le métabolisme du soufre. — *Progrès Médical* 1926 n° 46.
- [303] GAROLA et BRAUN. — Dosage du potassium à l'état de cobalti-nitrite. — *Ann. Fals.* 1917, n°s 109 et 110.
- [304] GRIFFON H. — Contribution à l'étude du microdosage du potassium. Applications biochimiques. — *Th. Pharm. Sup. Lyon* 1928.
- [305] HINGLAIS H. — Dosage du Cl et du S dans les végétaux. — *B. S. P.* 1926-33-625.
- [306] HOPKINS F. G. — *Bioch. J.* 1921-15-286.
- [307] HOPKINS F. G. — Glutathione. Its influence in the oxydation of Fats and Proteins. — *Bioch. J.* 1925-19-787.
- [308] HOPKINS F. G. — On glutathione: a reinvestigation. — *J. Biol. Chem.* 1929-84-269.
- [309] HOUSSAY et MAZZOCCO. — Le glutathion et les propriétés réductrices des tissus des rats décapsulés. — *S. B.* 1927-97-417.
- [310] HUNTER and EAGLES. — Glutathione. A critical study. — *J. Biol. Chem.* 1927-72-147.
- [311] JOHNSON J. M. and VOEGLIN C. — On the preparation and properties of pure glutathione. — *J. Biol. Chem.* 1927-75-703.
- [312] LEMATTE L., BOINOT G. et KAHANE E. — Dosage des minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie. — *J. P. C.* 1927-(8° s.)-5-325.
- [313] LESURE A. — Dosage du soufre dans les tissus et les liquides de l'organisme. — *Progrès Médical* 1926 n° 46.

- [314] LESURE A. et DUNEZ A. — Dosage du soufre dans le sang et les produits organiques. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1928-10-879.
- [315] LEULIER A. et FOUILLOUZE. — Dosage de l'arsenic et du soufre dans deux médicaments : novarsénobenzol et stovarsol. — *B., S. P.* 1925-32-129.
- [316] LEULIER A., VELLUZ L. et GRIFFON H. — Sur le microdosage du potassium à l'état de cobaltinitrite. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1928-10-891.
- [317] LEULIER A., VELLUZ L. et GRIFFON H. — Sur le microdosage du potassium dans les milieux biologiques. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1928-10-1238.
- [318] LOEPER M. — La thiémie normale et pathologique. — *Progrès Médical* 1926, n° 46.
- [319] LOEPER M., DECOURT et GARCIN. — La fonction soufrée de la surrénale. — *P. M.* 25 sept. 1926.
- [320] LOEPER M., DECOURT et GARCIN. — Les déchets soufrés de l'hémolyse. — *P. M.* 17 oct. 1928.
- [321] LOEPER M., DECOURT et LESURE. — L'accumulation du soufre dans la peau après surrénalectomie. — *S. B.* 1928-98-1098.
- [322] LOEPER M., DECOURT et TONNET. — Augmentation notable de la thiémie après surrénalectomie. — *S. B.* 1926-94-332.
- [323] LOEPER, GARCIN et LESURE. — La fonction thiopexique de la surrénale. — *S. B.* 1926-95-620.
- [324] LOEPER, GARCIN et LESURE. — Accroissement de la charge soufrée de la capsule surrénale par injection de soufre, de sang et d'albumines. — *S. B.* 1927-96-1107.
- [325] LOEPER, LESURE et TONNET. — Soufre et pigment surrénal. — *S. B.* 1926-94-740.
- [326] LOEPER, OLLIVIER et TONNET. — Le taux du soufre total et du soufre neutre dans le sérum des mélanodermiques. — *S. B.* 1925-93-95.
- [327] LURIE D. M. — On the storage of sulphur in the adrenal glands. — *Endoc.* 1928-12-84.
- [328] MEYER H. — Analyse et détermination de la constitution des composés organiques. — *Albin Michel, éd. Paris* 1924.
- [329] MEYERHOF O. — Ueber ein neues autoxydables System der Zelle. Die Rolle der Sulfhydrylgruppe als

- Sauerstoffüberträger. — *Pflüger's Archiv. f. Physiol.* 1923-199-531.
- [330] Mme POHORECKA-LELESZ. — Dosage microvolumétrique du soufre dans les liquides biologiques. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1927-9-263.
- [331] Mme RANDOIN et FABRE R. — Glutathion et avitaminose B chez le pigeon. — *B. Soc. Ch. Biol.* 1927-9-1027.
- [322] de REY-PAILHADE J. — Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre à froid. — *C. R.* 1888-106-1683.
- [333] SISLEY. — Modification à la méthode de dosage de l'azote par le procédé de Kjeldahl. — *B. Soc. Ch.* 1899-21-708.
- [334] THOMPSON J. W. and VOETGTLIN C. — Glutathione content of normal animals. — *J. Biol. Chem.* 1926-70-793.
- [335] TUNNICLIFFE G. E. — The occurrence and quantitative estimation of glutathione in tissues. — *Bioch. J.* 1925-19-194.

TABLE DES MATIERES

Introduction	Pages 7
---------------------------	------------

PREMIÈRE PARTIE

Préliminaires.

Chapitre I. — <i>Dualité morphologique des zones sur- rénales</i>	19
Chapitre II. — <i>Opérations préliminaires</i>	27

DEUXIÈME PARTIE

Adrénaline et Surrénales.

Chapitre I. — <i>Etat actuel de la question</i>	37
A. Avant la découverte et l'isolement de l'adré- naline	37
B. L'adrénaline	40
C. L'adrénaline dans les capsules surrénales ..	57
Chapitre II. — <i>Recherches chimiques personnelles sur l'adrénaline des capsules surrénales des Mammifères</i>	79
A. Etude critique des méthodes chimiques de dosage	79
B. Application de la méthode de Bailly au do- sage de l'adrénaline libre et virtuelle	99
C. Résultats. Adrénaline libre et virtuelle dans les capsules surrénales des Mammifères. Ré- partition	108

TROISIÈME PARTIE

Lipides des Surrénales.

Chapitre I. — <i>Généralités, Etat actuel de la question</i> ..	125
A. Historique	127

	Pages
B. Caractères et propriétés des lipides. Recherches et dosages	146
Chapitre II. — <i>Détection et localisation du cholestérol dans les capsules surrénales</i>	164
A. Les méthodes antérieurement utilisées	164
B. Les méthodes aux saponines	176
Chapitre III. — <i>Recherches chimiques sur les lipides des capsules surrénales de Mammifères</i>	197
A. Techniques de dosage. Résultats	197
B. Discussion des résultats	220

QUATRIÈME PARTIE

Répartition de quelques autres éléments dans les Capsules surrénales.

Soufre et Surrénales	247
Chapitre I. — <i>Etat actuel de la question</i>	247
A. Les procédés d'étude	247
B. Répartition. Localisation des produits soufrés.	251
C. Soufre et surrénales	256
Chapitre II. — <i>Recherches sur le Soufre des surrénales.</i>	262
A. Les méthodes	262
B. Résultats	270
C. Commentaires	271
Azote dans les capsules surrénales	274
Potassium dans les capsules surrénales	281

CINQUIÈME PARTIE

Vue d'ensemble du travail	287
Conclusions	299
Bibliographie	301

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

- 1) Phytostérols, en particulier Phytostérols des Champignons et des Monocotylédones.
- 2) Le Glutathion.

Lu et accepté,
Les Membres du Jury :

H. CARDOT,
J. BEAUVÉRIE,
C. FROMAGEOT,
A. LEULIER.

Vu et approuvé :
*Le Doyen de la
Faculté des Sciences,
Membre de l'Institut,*
V. GRIGNARD.

Vu, et permis d'imprimer :

Lyon, le 6 décembre 1930.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

Joseph GHEUSI.

